

Nachweis parodontopathogener Bakterien mittels quantitativer Real-time PCR

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae
(Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Thomas Voigt
geboren am 21. Mai 1978 in Potsdam

Gutachter

1. PD Dr. Sigrun Eick, Jena
2. Prof. Dr. Gisela Klinger, Jena
3. Prof. Dr. Thomas Hoffmann, Dresden

Tag der öffentlichen Verteidigung: 6.03.2007

Abkürzungsverzeichnis

<i>A.a. / A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
ATCC	American Type Culture Collection
API	Approximal plaque index
AP-PCR	Arbitrarily primed polymerase chain reaction
BOP	Bleeding on probing
CAL	Clinical attachment loss
<i>C.r. / C. rectus</i>	<i>Campylobacter rectus</i>
DNA	Deoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPS	Extrazelluläre Polysaccharide
<i>F.n./ F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>fimA</i> Typ II / Fimbrillinen Typ II	Fimbrillinen <i>fimA</i> Typ II
IL	Interleukin
KBE	Koloniebildende Einheiten
LPS	Lipopolysaccharid
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
<i>P.g./ P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P.i./ P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
RTX	Repeats in toxin
<i>S.c. / S. constellatus</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>
S-layer proteins	Surface-layer proteins
<i>T.d./ T. denticola</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>T.f./ T. forsythia</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
TSBV-Agar	Trypticase serum bacitracin vancomycin agar
<i>Treponema sp.</i>	<i>Treponema</i> species

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	5
2. Einleitung	7
2.1. Parodontitiden	7
2.2. Parodontopathogene Bakterien	11
2.3. Mikrobiologische Diagnostik	19
3. Zielstellung	23
4. Material und Methoden	24
4.1 Etablierung der Real-time PCR	24
4.2 Anwendung der Real-time PCR bei subgingivalen Plaqueproben	31
4.3 Statistische Methoden	35
5. Ergebnisse	36
5.1 Vergleich der Real-time PCR mit konventioneller PCR (microDent [®]) und mit Kulturverfahren	36
5.2 Bakterielle Besiedlung und Auftreten von Virulenzfaktoren in Abhängigkeit von der Sondierungstiefe	44
5.3 Korrelationsbetrachtungen zur nachgewiesenen Mikroflora	53
5.4 Statistischer Vergleich der Mikroflora von Parodontitispatienten vor Therapie mit Patienten nach nicht dauerhaft erfolgreicher Therapie	54
6. Diskussion	59
6.1 Material und Methoden	59
6.2 Vergleich der Real-time PCR mit konventioneller PCR (microDent [®]) und mit Kulturverfahren	63
7. Schlussfolgerungen	67
Literaturverzeichnis	68
Anhang	81

1 Zusammenfassung

Diese Studie beschäftigt sich mit der mikrobiologischen Diagnostik der Parodontitis in Anlehnung an die gültigen Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde und der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie. Demnach sollte bei der aggressiven Parodontitis, schweren Formen der chronischen Parodontitis, bei Parodontitis infolge systemischer Erkrankungen sowie bei Attachmentverlusten während der unterstützenden Nachbehandlung eine mikrobiologische Diagnostik angewendet werden. Als eine weitere Indikation können wissenschaftliche Studien gelten, die zur Evaluation der Therapie und bei epidemiologischen Fragestellungen auf die mikrobiologischen Verfahren zurückgreifen.

Zu denen am engsten mit der Progression der Parodontitiden verbundenen Bakterienspezies zählen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* sowie die Spirochäten einschließlich der Spezies *Treponema denticola*. Desweiteren werden bei den Spezies *Campylobacter rectus*, *Prevotella intermedia*, *Streptococcus constellatus* und *Fusobacterium nucleatum* Beziehungen zum Schweregrad der Parodontitis diskutiert. Ziel der vorliegenden Studie war die Etablierung einer Real-time PCR für diese Bakterienspezies.

Nach Literaturangaben erfolgte die Synthese und Erprobung der benötigten Primer mit einer konventionellen PCR. Anschließend wurden die PCR-Protokolle für die Real-time PCR separat für jede der zu untersuchenden Spezies sowie für die Virulenzfaktoren Leukotoxine (*A. actinomycetemcomitans*) und Fimbriinen *fimA* Typ II (*P. gingivalis*) erstellt. Um für die Ergebnisse einen einheitlichen Bewertungsmaßstab zu definieren, waren Referenzstämme zur Erstellung von Eichkurven eingesetzt worden.

Schliesslich erfolgte die mikrobiologische Diagnostik von 113 subgingivalen Plaqueproben von 32 Patienten mit einer schweren Form einer chronischen Parodontitis und von zwölf supragingivalen Proben von parodontal gesunden Personen.

Bei den Ergebnissen wurde insgesamt eine gute Übereinstimmung der Real-time PCR mit der konventionellen PCR und den Kulturverfahren festgestellt. Bei den Parodontitispatienten wurde *A. actinomycetemcomitans* in 34 Proben nachgewiesen, davon waren 13 Proben positiv

für das Leukotoxingen. Der Attachmentverlust korrelierte mit dem Nachweis Leukotoxingen-positiver Proben, nicht aber mit dem Nachweis von *A. actinomycetemcomitans*. Drei parodontal gesunde Personen zeigten einen positiven Nachweis für *A. actinomycetemcomitans*, eine Person war positiv für das Leukotoxingen. *P. gingivalis* konnte in 74 subgingivalen Plaqueproben von Patienten mit Parodontitis nachgewiesen werden, 44 waren positiv für das Fimbrilligen Typ II. In geringer Keimzahl trat *P. gingivalis* bei fünf parodontal gesunden Personen auf, davon waren zwei Personen positiv für das Fimbrilligen Typ II. Bei den Spezies *P. gingivalis*, *T. forsythia*, den *Treponema sp.* einschließlich *T. denticola*, *C. rectus* sowie *F. nucleatum* war eine Abhängigkeit von der Sondierungstiefe feststellbar, ebenso bei dem Fimbrilligen Typ II. Mit zunehmenden BOP-Werten stieg die Zahl der Spezies *S. constellatus* und *P. intermedia*.

Im Vergleich der Parodontitispatienten vor Therapiebeginn mit den Parodontitispatienten ohne dauerhaften Therapieerfolg war die Gesamtzahl der Bakterien in der ersten Gruppe deutlich gegenüber der zweiten Gruppe erhöht. Ebenso zeigten sich in der Gruppe der Parodontitispatienten vor Therapie signifikant erhöhte Bakterienmengen für die Spezies *T. denticola*.

Die Real-time PCR stellt ein zeit- und kosteneffizientes Verfahren dar. Die Diagnostik der parodontalen Mikroflora sollte *A. actinomycetemcomitans* einschließen. Hier erscheint eine Beschränkung auf die Leukotoxingen-positiven Stämme sinnvoll. Weiterhin sollten in der Analyse *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* berücksichtigt werden. In einer umfangreicheren Diagnostik sind daneben auch *S. constellatus*, *P. intermedia*, *C. rectus* und *F. nucleatum* zu erfassen.

2 Einleitung

Parodontale Erkrankungen wurden bereits im Altertum in Mesopotamien und auch bei den ägyptischen Mumien in Gizeh nachgewiesen (Neiburger 2000, Hoffmann 2005). Diese Erkrankungen begleiten demnach seit Menschengedenken die Zivilisation und stellen auch für die moderne Zahnmedizin eine besondere Herausforderung dar. Die Dritte Deutsche Mundgesundheitsstudie weist in der Gruppe der 35 bis 44-Jährigen bei bereits 30% der Personen schwere Parodontalerkrankungen nach, während ihre Zahl in der Gruppe der 65 bis 74-Jährigen auf 55% ansteigt. Mit 24% zeigt fast ein Viertel dieser Altersgruppe bei der klinischen Untersuchung tiefe Parodontaltaschen, aber auch schon 14% der 35 bis 44-Jährigen leiden unter starkem Attachmentverlust (Micheelis und Reich 1999).

Bei den Parodontitiden handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen mit signifikanten Unterschieden in der Zusammensetzung der subgingivalen Plaque. Einerseits können sie als opportunistische Infektionserkrankung angesehen werden, während andererseits einzelne Erreger wie *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* den Charakter exogener pathogener Spezies besitzen und selten bei parodontal gesunden Personen nachgewiesen werden (van Winkelhoff und Boutaga 2005). Die mit der bakteriellen Besiedlung einhergehende Destruktion des Parodonts begründet sich in den Wechselwirkungen von bakteriellem Stoffwechsel und der immunologischen Reaktion des Wirtes (Pfister 2005).

Mikrobiologische Untersuchungen besitzen einen hohen Stellenwert in der Diagnostik der Erkrankung, bei der Auswahl einer geeigneten Antibiotikatherapie, für die Prognose sowie zur Bestätigung des Behandlungserfolges (Sixou 2003).

2.1 Parodontitiden

Klinische Merkmale der Parodontitis sind die Bildung von Zahnfleischtaschen, das Auftreten von klinischem Attachmentverlust sowie Knochenresorption, wobei die Progression von der Wirtsreaktivität abhängig ist (Hoffmann 2005).

Bei einer leichten bis moderaten Parodontitis treten als lokal erfassbare klinische Zeichen Ödeme, Erytheme, eine gingivale Blutung bei Sondierung, Attachmentverluste bis 4 mm, Sondierungstiefen unter 6 mm und gegebenenfalls eine Suppuration auf, während die

schweren Formen einer Parodontitis mit Sondierungstiefen > 6 mm, einem Attachmentverlust > 4 mm und einem Verlust von mehr als einem Drittel des Zahnhalteapparates sowie Knochenverlusten einhergehen (AAP 2000).

Die klinische Diagnostik bedient sich standardisierter Indizes zur Beschreibung der Parodontitiden. Die Plaqueakkumulation kann mit dem Approximalraum-Plaueindex (API, Lange 1977) gemessen werden. Der Grad der Entzündung wird mittels Blutung nach Sondieren – Bleeding on Probing (BOP, Ainamo und Bay 1975) gemessen. Weiterhin spielen bei der klinischen Diagnostik das Erfassen der Sondierungstiefe sowie des klinischen Attachmentverlustes eine große Rolle.

Der klinische Attachmentverlust (*engl.* clinical attachment loss, CAL) wird bei 1 – 2 mm als geringgradig, bei 3 – 4 mm als moderat und ≥ 5 mm als schwer bezeichnet (Armitage 1999). Als frühzeitige Indikatoren einer Parodontitisprogression können BOP und CAL bestätigt werden (Tanner et al. 2005).

Klassifikation parodontaler Erkrankungen

Die zur Zeit gültige Klassifizierung wurde 1999 im "International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions" festgelegt. Sie unterscheidet die heterogene Gruppe der Parodontitiden ätiologisch und nimmt eine schweregradbezogene Einteilung vor, während die altersabhängige Beschreibung entfällt (Armitage 1999).

Die folgende Übersicht zeigt die Klasseneinteilung:

- Gingivale Erkrankungen (plaqueinduziert / nicht plaqueinduziert)
- Chronische Parodontitis (lokalisiert / generalisiert)
- Aggressive Parodontitis (lokalisiert / generalisiert)
- Parodontitis als Manifestation einer Systemerkrankung
- Nekrotisierende Parodontalerkrankungen
- Abszesse des Parodonts
- Parodontitis im Zusammenhang mit endodontischen Läsionen
- Entwicklungsbedingte oder erworbenen Deformationen und Zustände

Die chronische Parodontitis wurde vor Änderung der Nomenklatur als „Adulte Parodontitis“ oder „Parodontitis marginalis superficialis“ bezeichnet. Klinische und epidemiologische

Untersuchungen ließen erkennen, dass diese Form der Parodontitis nicht nur bei Erwachsenen, sondern auch bei Jugendlichen angetroffen werden kann, weshalb die altersbezogene Einteilung der Parodontitiden verlassen wurde (Papapanou 1996, Armitage 1999). Die chronische Parodontitis kann in fast allen Altersgruppen auftreten, die stärkste Prävalenz ist aber weltweit bei den Erwachsenen und Senioren festzustellen (Albandar 2005). Von einer generalisierten Form der chronischen Parodontitis ist ab einem Befall von mehr als 30% der Zahnflächen zu sprechen, während eine lokalisiert auftretende chronische Parodontitis weniger als 30% der Zahnflächen betrifft (Armitage 1999).

Die aggressive Parodontitis ist durch einen raschen Attachmentverlust und massiven Abbau von Alveolarknochen gekennzeichnet, wobei insbesondere *A. actinomycetemcomitans* mit seinen Virulenzfaktoren, wie dem Leukotoxin, eine bedeutende Rolle bei der lokalisierten aggressiven Parodontitis spielt (Zambon 1985, Diaz et al. 2006). Die Besiedlung der subgingivalen Plaque durch *A. actinomycetemcomitans* korreliert bei der aggressiven Parodontitis mit den in der Sulkusflüssigkeit nachweisbaren Antikörpertitern gegen den Erreger (Genco et al. 1985). Erhöhte Antikörpertiter gegen *A. actinomycetemcomitans* können bei der aggressiven Parodontitis auch im Serum und Speichel nachgewiesen werden (Zambon 1985). Daher begründet sich hierbei die Pathogenität der Plaque weniger quantitativ denn vielmehr qualitativ.

Ätiologie und Pathogenese der Parodontitiden

Die Bakterien spielen bei der Auslösung von parodontalen Erkrankungen eine entscheidende Rolle, jedoch beeinflussen eine Reihe von individuellen, wirtsspezifischen Faktoren, beispielsweise das Rauchen oder der Diabetes mellitus, das klinische Erscheinungsbild und das Ausmaß des Erkrankungsfortschrittes (van Winkelhoff 2003, Heitz-Mayfield 2005).

Die ethnische Zugehörigkeit, der Bildungsstand und sozioökonomische Bedingungen haben einen Einfluss auf die Etablierung von Parodontitiden (Borell et al. 2006). Psychischer Stress korreliert positiv mit parodontalem Knochenabbau (Dolic et al. 2005). Erhöhte Cortisolspiegel als ein Kennzeichen für psychischen Stress stehen in einem kausalen Zusammenhang mit der Zunahme der Sondierungstiefe sowie der Steigerung des klinischen Attachmentverlustes (Hilgert et al. 2006).

Rauchen konnte als klarer Risikofaktor für Parodontitiden identifiziert werden, es besteht eine Dosisabhängigkeit (Micheelis und Reich 1999, Heitz-Mayfield 2005).

Patienten mit einem unbehandelten oder ungenügend eingestellten Diabetes mellitus besitzen ein größeres Risiko, an einer Parodontitis zu erkranken (Heitz-Mayfield 2005). Unter den systemischen Erkrankungen konnte allein dem Diabetes mellitus eine positive Assoziation mit einem klinischen Attachmentverlust zugeschrieben werden (Grossi et al. 1994).

Genetische Faktoren werden ebenso als Risikofaktoren diskutiert. In den letzten Jahren stellten verschiedene Genpolymorphismen bei der chronischen Parodontitis den Gegenstand umfangreicher Untersuchungen dar. Als Beispiele dienen der Interleukin-1-Polymorphismus (Freyer 2003) sowie der TNF- α -Polymorphismus (D'Aiuto et al. 2004).

Bezüglich der Pathogenität der dentalen Plaque wurden in den letzten Jahrzehnten unterschiedliche Theorien formuliert, wie die unspezifische Plaquehypothese, die ein quantitatives Verhältnis zwischen der Plaque und ihrer Pathogenität voraussagt (Theilade 1986) und die spezifische Plaquehypothese, welche von der Pathogenität einzelner Spezies ausgeht (Sokransky et al. 1998, Overman 2000).

Für die dentale Plaque als Biofilm sind der pathogen wirkende Synergismus bestimmter Bakterienspezies und eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen charakteristisch (Marsh 2005). Die subgingivale Plaque entspricht einer bakteriellen Gemeinschaft mit den wesentlichen Eigenschaften Autopoesis, Homöostase, Synergie und Gemeinschaftsgrad (*engl.* communality) (Caldwell et al. 1997). Autopoesis bedeutet eine sich selbstorganisierende Gemeinschaft, Synergie meint eine größere Effektivität der Bakterien gegenüber dem isolierten Zustand, und Homöostase beschreibt die Fähigkeit dieses Biofilms, den schwankenden Umwelteinflüssen zu widerstehen. Der Gemeinschaftsgrad, abgeleitet aus mathematisch-statistischen Beschreibungen, spiegelt die Eigenschaft des aus vielen Bakterienzellen zusammengesetzten Biofilms wider, nach außen hin wie eine Einheit zu erscheinen (Caldwell et al. 1997).

Neben den Mikroorganismen als wichtigste Komponente eines Biofilms werden die extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) sowie darin eingebundene anorganische Bestandteile als charakteristisch angesehen. Aufgrund der Immobilisation von Exoenzymen in

der unmittelbaren Nachbarschaft der Bakterien hat diese extrazelluläre Schleimmatrix eine besondere Bedeutung als Reaktionsraum (Szewzyk und Szewzyk 2003).

Die Fähigkeit der parodontopathogenen Erreger, dank spezifischer Adhäsine epitheliale Zellen und die Wurzeloberfläche zu besiedeln, fördert die Biofilmbildung und den pathogenetischen Ablauf der Entzündung (Pfister 2005). Das bei gramnegativen Bakterien ubiquitär vorkommende Lipopolysaccharid (LPS) spielt bei der Ausschüttung gewebsschädlicher Faktoren aus Wirtszellen eine wichtige Rolle (Nair et al. 1996).

Infolge der Immunantwort auf die parodontopathogenen Erreger wird eine durch proinflammatorischen Zytokine gesteuerte Knochenresorption ausgelöst (Lerner 2004). Diese aus T-Lymphozyten stammenden Zytokine Interleukin-1 (IL-1) und der Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) induzieren die Knochenresorption durch Aktivierung der Osteoklasten (Pfeilschifter et al. 1989).

Parodontopathogene Bakterien können im menschlichen Organismus auch außerhalb der Mundhöhle nachgewiesen werden. Die Fähigkeit dieser Bakterienspezies zur Invasion humaner Endothelzellen der Koronararterien wurde nachgewiesen (Dorn et al. 1999). Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten parodontopathogener Bakterien in der Mundhöhle und in den Atheromen von Koronararterien konnte ebenfalls belegt werden (Ishihara et al. 2004).

2.2 Parodontopathogene Bakterien

Für die Ätiologie der Parodontitiden spielen von den über 500 in der Mundhöhle nachgewiesenen Bakterienarten nur einige Spezies eine besondere Rolle (Paster et al. 2001). Die parodontopathogenen Bakterien besitzen Virulenzfaktoren und sind in hoher Zellzahl beim Erkrankten isolierbar, dagegen bei den parodontal gesunden Personen nur in geringer Zahl anzutreffen oder abwesend (Socransky 1979). Wegbereitend für die subgingivale Plaque mit den Protease-produzierenden Bakterien *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* und *T. denticola* scheinen die bioaktiven Stoffwechselprodukte der supragingivalen Plaque zu sein, wie organische Säuren und gewebsschädigende Enzyme (Nishihara und Koseki 2004).

Bei mikrobiologischen Untersuchungen der subgingivalen Plaque werden häufig bestimmte parodontopathogene Bakterienspezies in „mikrobiellen Komplexen“ angetroffen (Socransky et al. 1998): Zu dem „roten Komplex“ werden *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* zusammengefasst. Der rote Komplex als Gesamtheit, aber auch die einzelnen Spezies *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* sind streng mit hohen BOP-Werten assoziiert. *P. gingivalis* tritt außerdem nie in Abwesenheit von *T. forsythia* auf.

Der „orange Komplex“ enthält die Fusobakterien, unter anderem *Fusobacterium nucleatum*. Zusätzlich befinden sich in diesem Komplex *Streptococcus constellatus*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella intermedia* und *Prevotella nigrescens*. Diese Spezies stehen in engem Kontakt zum „roten Komplex“, gelten als Brückenkeime und treten häufiger mit einer zunehmenden Sondierungstiefe auf. Der „grüne Komplex“ enthält als wichtigsten Vertreter *A. actinomycetemcomitans* und steht in keiner erkennbaren Beziehung zu anderen Vertretern der subgingivalen Plaque. In den anderen Komplexen sind die initialen Besiedler der Plaque, wie *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. intermedius*, *S. gordonii* und die Aktinomyzeten zusammengefasst (Socransky et al. 1998).

Parodontopathogene Bakterien, wie beispielsweise *P. gingivalis*, entziehen sich der Wirtsabwehr durch gezielte Invasion oraler Epithelzellen (Madianos et al. 1996). Sie sind zur Aktivierung des Komplementsystems, zur Störung der unspezifischen Immunreaktion, zur Aktivierung von Osteoklasten und zur Einflußnahme auf die Zytokinfreisetzung fähig. Darüber hinaus produzieren sie zytotoxische Substanzen wie Ammoniak, Amine und organische Säuren (Pfister 2005).

Die wegen ihrer parodontopathogenen Eigenschaften bedeutsamen Spezies *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *T. denticola* sowie *F. nucleatum*, *C. rectus* und *S. constellatus* werden nachfolgend genauer charakterisiert.

Actinobacillus actinomycetemcomitans

Es handelt sich um nicht bewegliche, fakultativ anaerobe (kapnophile) gramnegative Stäbchen, die keine Sporen bilden.

In der Ätiologie der Parodontitis spielt *A. actinomycetemcomitans* eine bedeutende Rolle, dieses Bakterium dringt in die epitheliale Barriere ein und kann sich somit in den Wirtszellen

vermehrten (Meyer et al. 1991 und 1996). Die Spezies ist Bestandteil der dentalen Plaque und wird im besonderen Maß in parodontalen Taschen und auf der bukkalen Mukosa angetroffen (Zambon 1985). Insbesondere bei der aggressiven Parodontitis besitzt *A. actinomycetemcomitans* eine hohe Prävalenz (Zambon 1985). Das Auftreten von *A. actinomycetemcomitans* und parodontalen Taschen > 5 mm lassen auf die Progression einer Parodontitis schließen (Timmerman und Weijden 2006).

Bei den Virulenzfaktoren von *A. actinomycetemcomitans* werden immunmodulierende Faktoren, gewebeschädigende Faktoren sowie Faktoren, welche die Adhäsion und Invasion des Bakteriums unterstützen, unterschieden (Henderson et al. 2003).

Als wesentlicher Virulenzfaktor des *A. actinomycetemcomitans* wird das *Leukotoxin* betrachtet (Tsai et al. 1979). Dabei handelt es sich um ein porenformendes, antichemotaktisches Protein, welches die Bakterien überwiegend in ihrer Außenmembran tragen (Diaz et al. 2006). Es gehört zur RTX-Familie (Repeats in toxin) und führt in hohen Dosen zur irreversiblen Schädigung der Zellmembran von Monozyten (Taichman et al. 1980) sowie neutrophilen HL-60-Zellen (Zambon et al. 1983) und damit zur osmotischen Lyse dieser Zellen. Die Ausschaltung der gezielten Immunantwort durch Nekrose der Makrophagen bewirkt darüber hinaus eine Freisetzung von freien Radikalen und Enzymen mit nachfolgender Schädigung des Bindegewebes.

Die Wirkung des Leukotoxin findet gezielt auf PMN-Zellen statt und ist zeit-, dosis- und temperaturabhängig (Tsai et al. 1979). Während der Virulenzfaktor in niedrigeren Dosen in Monozyten eine schnelle Produktion und Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α und IL-1 β induziert, bewirken hohe Leukotoxin-Dosen neben dem Zelltod eine begrenzte Ausschüttung bioaktiver Zytokine (Kelk et al. 2005).

Die Produktion von Leukotoxin ist abhängig vom *A. actinomycetemcomitans*-Stamm und wird auf der Transkriptionsebene beeinflusst (Spitznagel et al. 1991). Unterschiedliche Genexpressionen sind bei den Stämmen *A. actinomycetemcomitans* Y4 und JP2 nachweisbar (Kolodrubetz et al. 1996). Der besonders virulente klonale Stamm *A. actinomycetemcomitans* JP2 weist als Besonderheit eine Deletion eines Segmentes von 533 Basenpaaren in der Promotorregion des Leukotoxin-Operons auf, wodurch eine deutlich erhöhte Genexpression bedingt ist (Kolodrubetz et al. 1996). Betroffen sind Familien afrikanischer Herkunft als

Träger des klonalen Stammes *A. actinomycetemcomitans* JP2, die gegenüber der Normalbevölkerung weltweit eine erhöhte Prävalenz für die Ausbildung einer aggressiven Parodontitis besitzen. So zeigten marokkanische Patienten, die JP2-positiv waren, einen signifikant größeren Attachmentverlust (Haubek et al. 2004).

Der klonale Stamm Y4 produziert Leukotoxin (Taichman et al. 1980). Das Vorhandensein des entsprechenden *lktA*-Gens kann mittels PCR nachgewiesen werden (Goncharoff et al. 1993). Bei Patienten mit einer lokalisierten aggressiven Parodontitis ist im Vergleich zu parodontal Gesunden die Rate der Leukotoxin-produzierenden Stämme mit 66% deutlich erhöht, während bei parodontal gesunden Personen nur 16% der Isolate Leukotoxin-positiv sind (Zambon et al. 1983).

Weitere gewebsschädigende Virulenzfaktoren von *A. actinomycetemcomitans* sind das *Cytolethal distending toxin* (CDT) (Sugai et al. 1998, Akifusa et al. 2001, Henderson et al. 2003) und das Hitzeschockprotein *GroEL* (Kirby et al. 1995).

Porphyromonas gingivalis

Bei *P. gingivalis* handelt es sich um anaerobe, gramnegative, nicht sporenbildende Stäbchen (*Bacteroidetes*).

Die heutige Bezeichnung ersetzte 1986 den bis dahin gültigen Terminus *Bacteroides gingivalis*. Ausgangspunkt zur subgingivalen Besiedlung ist eine überwiegend grampositive supragingivalen Plaque (Slots und Gibbons 1978). Als sekundärer Besiedler trägt *P. gingivalis* wesentlich zur Auslösung und Progression schwerer Parodontitiden bei. Die sich sehr schnell entwickelnden, schweren Formen der Parodontitis bei Erwachsenen können durch die hochpathogene Aktivität von *P. gingivalis* charakterisiert werden (Sixou 2003).

P. gingivalis kann in parodontalen Taschen fast die Hälfte der kultivierbaren gramnegativen Isolate ausmachen (Slots und Gibbons 1978). Die Kultivierung findet unter strikt anaeroben Bedingungen statt. *P. gingivalis* koaggregiert mit Fusobakterien, nicht aber mit Aktinomyzeten oder *S. mutans* (Kolenbrander und Andersen 1989). Mit *S. gordonii* hingegen kann *P. gingivalis* eine proteinvermittelte spezie-spezifische Bindung eingehen (Demuth et al. 2001).

Die Fähigkeit zur Invasion von Epithelzellen gehört zu den Überlebensstrategien von *P. gingivalis*, um der Immunabwehr zu entgehen (Lamont et al. 1995). Im Laborversuch konnte *P. gingivalis* acht Tage in KB-Zellen persistieren (Madianos et al. 1996). Die Fähigkeit von *P. gingivalis*, Wirtszellen zu invadieren, steht in einem kausalen Zusammenhang zur Unterdrückung der Diapedese (Transmigration) von PMN-Zellen in Abhängigkeit von der Erregerkonzentration (Madianos et al. 1997). Für die Chronizität der Parodontalerkrankung scheint die Fähigkeit von *P. gingivalis* zur Zellinvasion eine Schlüsselrolle zu spielen (Eick et al. 2002).

Zu den Virulenzfaktoren von *P. gingivalis* zählen seine Fimbrien und Proteasen. Bei den Fimbrien handelt es sich um reversibel ausgebildete, mit Adhäsionsmolekülen besetzte filamentöse Oberflächenfortsätze. Die Fimbrien von *P. gingivalis*, die in fünf Typen (I-V) unterschieden werden, sind peritrich angeordnet. Die Unterteilung in diese Typen bezieht sich auf das für die Untereinheit Fimbrillin kodierende *fimA*-Gen. (Nakagawa 2000, Amano et al. 2003).

Zwischen dem Auftreten des Fimbrilligen *fimA* Typ II und der Sondierungstiefe ist eine lineare Beziehung bei Parodontitispatienten nachweisbar (Amano et al. 1999). Gegenüber flachen Parodontaltaschen (4 mm) trat der *fimA* Typ II in tiefen Taschen (≥ 8 mm) deutlich häufiger auf. Die Inzidenz von *fimA* Typ II in der Altersgruppe der 36 bis 57-Jährigen war unabhängig vom Geschlecht erhöht. Eine Verbindung von *fimA* Typ II und dem Fortschreiten der Parodontitis ist damit wahrscheinlich, hingegen war eine Häufung von BOP und einem bestimmten Fimbrientyp nicht nachweisbar (Amano et al. 1999).

Die Genexpression von Fimbrillin wird auf der Transkriptionsebene beeinflusst und kann durch andere Bakterienspezies moduliert, gegebenenfalls sogar unterbunden werden, wie durch den Erstbesiedler *Streptococcus cristatus* (Xie et al. 2004). Dank seiner Fimbrien kann *P. gingivalis* sich bei speichelbenetzten Oberflächen anheften, insbesondere findet eine Interaktion mit den Pellikelproteinen statt (Amano et al. 1994). Die Fimbrien binden an Epithelzellen (Isogai et al. 1988, Weinberg et al. 1997), an Hämoglobin (Amano et al. 1995), sowie an Fibroblasten und an Matrixproteine (Kontani et al. 1996). Außerdem konnte im Tierversuch die Bindung der Fimbrien an die $\beta 2$ Integrin-Untereinheit von Peritoneal-Makrophagen und die nachfolgende Genexpression von Interleukin-1 β und TNF- α nachgewiesen werden (Takeshita et al. 1998).

Die Lysin- und argininspezifischen Cysteinproteasen (Gingipaine) besitzen eine Schlüsselfunktion für die Pathogenität dieses Bakteriums. Sie bauen Immunglobuline und Proteinaseinhibitoren des Wirtes ab, aktivieren das Komplementsystem, das Kallikrein-Kinin-System sowie die wirtseigenen Matrixmetallproteinasen (Pfister 2005). Arginin-spezifische Proteasen (arg-Gingipain) spalten Fibronectin und das $\alpha 5 \beta 1$ Membranintegrin. Nachfolgend findet eine Blockade der Integrin-Ligand-Interaktion menschlicher Fibroblasten statt (Scragg et al. 1999). Die mit extrazellulären Membranvesikeln assoziierten arg-Gingipaine können auf der bakteriellen Zelloberfläche nachgewiesen werden und unterstützen neben den Fimbrien die Zelladhäsion von *P. gingivalis* an oralen Epithelzellen maßgeblich (Chen et al. 2001). Hingegen korreliert die Aktivität der Lysin-spezifischen Proteasen negativ mit der Zelladhäsion (Eick et al. 2002). Eine Aktivität von Arg-Gingipain besteht sogar nach Vitalitätsverlust der Bakterienzelle, wodurch *P. gingivalis* seine Virulenz weiter steigern kann (Kamaguchi et al. 2004).

Auch andere Proteasen von *P. gingivalis* unterstützen die Virulenz, wobei die Dipeptidyl-aminopeptidase IV durch gezielte Kollagenspaltung eine Bindegewebsdestruktion bewirkt (Kumagai et al. 2005).

Prevotella intermedia

Diese gramnegative Bakterienspezies (Familie *Bacteroidetes*) tritt häufig mit *P. gingivalis* assoziiert auf (Kamaguchi et al. 2001). Eine Abtrennung von *Prevotella nigrescens* gegenüber *P. intermedia* wurde vorgenommen (Shah und Gharbia 1993). Diese beiden Bakterienspezies sind in vivo nur zusammen mit *A. actinomycetemcomitans* bzw. *S. mitis* in der Lage, Abszesse auszulösen (Hafstrom und Dahlen 1997). Ihre mikrobiologische Unterscheidung gelingt mit der PCR schnell und reproduzierbar (Premaraj et al. 1999). Die Spezies *P. intermedia* ist innerhalb der Gruppe der schwarz pigmentierten Stäbchen sowohl im gesunden als auch im erkrankten Parodontium vorherrschend (Maeda et al. 1998). In einer Vielzahl von subgingivalen Plaqueproben, die von Patienten mit aggressiver und auch chronischer Parodontitis stammen, ist *P. intermedia* nachzuweisen (Mombelli et al. 2002).

Die Virulenz von *P. intermedia* wird durch die selbst produzierten Kollagenasen mitbestimmt (Sorsa et al. 1992). Diese Spezies ist ebenfalls zur Invasion menschlicher Epithelzellen befähigt (Dorn et al. 1998).

Tannerella forsythia

Es handelt sich um gramnegative, obligat anaerobe Stäbchen der Familie *Bacteroidetes*. Ein enger Zusammenhang besteht zwischen BOP und dem Auftreten von *T. forsythia* (Socransky et al. 1998, Kook et al. 2005). Als stark parodontopathogene Spezies tritt *T. forsythia* im „roten Komplex“ zusammen mit *P. gingivalis* und *T. denticola* häufig gemeinsam auf (Socransky et al. 1998).

Mit der PCR auf der Basis des 16S rRNA-Gennachweises kann *T. forsythia* bei Parodontitispatienten in einem signifikant höheren Anteil als bei den parodontal Gesunden nachgewiesen werden (de Lillo et al. 2004). Während ein Viertel der Jugendlichen dauerhafter Träger von *T. forsythia* ist, beträgt der Anteil bei den Erwachsenen 37%, eine hohe Keimzahl in den parodontalen Taschen wurde bei 11% der Erwachsenen nachgewiesen (Narayanan et al. 2005). Bei den tiefen parodontalen Taschen tritt *T. forsythia* häufiger auf (Socransky et al. 1998).

Treponema species

Die Familie der *Spirochaetaceae* umfasst gramnegative, anaerobe, spiralig gekrümmte Stäbchen mit zehn bis 20 Primärwindungen, die durch Rotation um ihre Längsachse beweglich sind. Die Spirochäten sind in drei Gattungen aufgeteilt. Die oralen Spirochäten gehören der Gattung *Treponema* an, daneben existieren die Gattungen *Borrelia* und *Spirochaeta*. Der Nachweis erfolgt über Dunkelfeldmikroskopie oder Antikörpertests, Kulturverfahren sind hingegen aufwändig.

Treponema denticola ist in Plaqueproben tiefer parodontaler Taschen (> 6 mm) von Patienten mit einer schweren Parodontitis häufig anzutreffen (Simonson et al. 1988).

Die Virulenz der Spirochäten wird wesentlich durch ihre Motilität und der damit ermöglichten Penetration humaner Epithelien bestimmt; bei *T. denticola* sind zusätzlich Chemorezeptoren an der Invasion oraler Epithelzellen beteiligt (Lux et al. 2001). Die enzymatische, chymotrypsin- bzw. trypsinähnliche Aktivität von *T. denticola* mit der Fähigkeit zur Spaltung von Estern, Amiden und Peptiden unterstützt seine parodontopathogene Potenz (Ohta et al. 1986, Uitto et al. 1988).

Streptococcus constellatus

Die Gattung *Streptococcus* enthält neben der allgemeinmedizinisch bedeutsamen Gruppe der pyogenen, hämolytischen Streptokokken die Gruppe der oralen, vergrünenden Streptokokken (Viridans-Gruppe), zu der *Streptococcus constellatus* gehört. Weitere Vertreter der Viridans-Gruppe sind *S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. mitis*, *S. milleri*, *S. anginosus* und *S. intermedius*.

Es handelt sich bei *S. constellatus* um grampositive, aerobe, unbewegliche Kokken, die zumeist in Ketten angeordnet sind. Der Erregernachweis kann über Kulturverfahren oder eine Antigenuntersuchung geführt werden. *S. constellatus* kann hinsichtlich seiner Parodontopathogenität dem „orangenen Komplex“ zugeordnet werden (Socransky et al. 1998). Die Spezies wird zusammen *S. intermedius* und *S. anginosus* in Verbindung mit der nicht erfolgreich therapierten Parodontitis beschrieben (Colombo et al. 1998).

Campylobacter rectus

Der zur Familie der *Proteobacteria* gehörende Erreger bevorzugt das mikroaerophile Milieu. *C. rectus* ist in der Gramfärbung negativ und lässt sich anhand der spiralig gekrümmten, bewegliche Stäbchen, die an einem oder beiden der Pole mit einer Geißel besetzt sind, erkennen. Eine Kultur muss mit speziellen Selektivmedien erfolgen. Der Nachweis von *C. rectus* in der subgingivalen Plaque ist bei Patienten mit Parodontitis gegenüber parodontal gesunden Personen erhöht (Ximénez-Fyvie et al. 2000). Diese Spezies wird ebenfalls den parodontopathogenen Erregern des „orangenen Komplexes“ zugeordnet (Socransky et al. 1998).

Die Oberflächenproteine von *Campylobacter rectus* (S-layer proteins) schützen vor einer komplementvermittelten Immunantwort (Thompson 2002). Diese parakristallinen Proteine erhöhen in Fibroblasten die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α , IL-6 und IL-8 (Wang und Kraig 2000).

Fusobacterium nucleatum

Es handelt sich um spindelförmige, unbewegliche, nicht sporenbildende Stäbchen, die obligat anaerob und gramnegativ sind. *Fusobacteria* findet man häufig als Teil der normalen Mund- und Darmflora des Menschen, daher entstehen Allgemeininfektionen zumeist endogen durch

die mikrobielle Flora des Patienten. Speziell bei schweren Allgemeininfektionen ist *F. nucleatum* häufig beteiligt (Bolstad et al. 1996). *F. nucleatum* stellt eine wesentliche Komponente des parodontopathogenen Biofilmes in den parodontalen Taschen dar und ist an der Entstehung sowohl von Gingivitiden als auch von Parodontitiden beteiligt.

Es wird vermutet, dass Fusobakterien bei der Ausbildung mikrobieller Gemeinschaften der Mundhöhle eine Schlüsselrolle spielen (Kolenbrander et al. 1995). Dabei besitzt *F. nucleatum* eine Brückenfunktion durch Vermittlung verschiedener Koaggregationen mit anderen oralen Bakterien (Bolstad et al. 1996). Fusobakterien gehen insbesondere mit *P. gingivalis* eine Koaggregation ein, die durch Laktose und verwandte Zucker inhibiert werden kann (Kolenbrander und Andersen 1989). Synergistische Beziehungen in Form von adhäsionvermittelten Zell-Zell-Kontakten werden auch zwischen *T. forsythia* und *F. nucleatum* angetroffen (Sharma et al. 2005). Die äußeren Membranproteine werden als Hauptvirulenzfaktor von *F. nucleatum* angesehen (Bakken et al. 1989).

2.3 Mikrobiologische Diagnostik

Die mikrobiologische Diagnostik dient zumeist der Vorbereitung einer systemischen adjuvanten Antibiotikatherapie von Parodontitiden und ist indiziert bei aggressiven Parodontitiden sowie schweren Formen der chronischen Parodontitis (Beikler et al. 2005). Weiterhin können mikrobiologische Untersuchungen die Therapiemaßnahmen bei Parodontitiden mit progredientem Attachmentverlust sowie mittelschweren bis schweren Parodontitiden bei systemischen Erkrankungen und Zuständen, welche die Funktion des Immunsystems beeinträchtigen, begleiten (Beikler et al. 2005). Auch Patienten mit aktiv fortschreitender Erkrankung nach systemischer Antibiose und Patienten mit Periimplantitis sollten einer mikrobiologischen Diagnostik unterzogen werden. (van Winkelhoff 2003).

Im Gegensatz zu den klinischen Parametern, die den Ist-Zustand dokumentieren, besitzen mikrobiologische Nachweisverfahren auch einen prädiktiven Wert (Machtei et al. 1999).

Als parodontopathogene Mikroorganismen kommen für eine mikrobiologische Untersuchung *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* (Ashimoto et al. 1996,

Tran und Rudney 1999), die *Treponema sp.* (Asai et al. 2002) einschliesslich *T. denticola* (Sakamoto et al. 2001), *C. rectus* (Ashimoto et al. 1996), *S. constellatus* (Jacobs et al. 1996), und *F. nucleatum* (Jervøe-Storm et al. 2005) in Betracht. Der Zeitpunkt der mikrobiologischen Diagnostik sollte nach der initialen Parodontalbehandlung gewählt werden (van Winkelhoff 2003).

Konventionelle und immunologische Verfahren

Kulturverfahren gelten als Referenzmethode, da sie nicht auf einzelne Bakterienspezies gerichtet sind und damit den Nachweis einer großen Breite von Mikroorganismen ermöglichen (Sixou 2003). Sie erlauben als offenes System die Kultivierung und eine Resistenzbestimmung gegen Antibiotika (van Winkelhoff 2003). Bisher konnten allerdings nur ungefähr 50% der oralen Mikroflora mit Standardverfahren kultiviert werden (Paster et al. 2001).

Die Komplexität der Kulturverfahren hinsichtlich der anaeroben Mikroflora hat zur Anwendung immunologischer und molekularbiologischer Testverfahren geführt (Sixou 2003). Als nachteilig haben sich bei den Kulturverfahren besonders die eingeschränkte Transportzeit der Proben (maximal 48 Stunden) und die zeitintensiven Arbeitsabläufe erwiesen (van Winkelhoff 2003).

Immunologische Testverfahren sind der Latex-Agglutinationstest, die Durchflusszytometrie, der „Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay“, ELISA-Test, und die direkte oder indirekte Immunfluoreszenz (Sixou 2003). Der Latex-Agglutinationstest, für den in der zahnärztlichen Praxis Nachweis-Kits für *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* und *P. intermedia* zur Verfügung stehen, besitzt allerdings nur eine schwache Sensitivität (Sixou 2003). Die Nutzung monoklonaler Antikörper, welche nur mit bekannten Serotypen interagieren, kann zu falsch negativen Ergebnissen führen (Sixou 2003).

Molekularbiologische Nachweisverfahren

Vergleichende Untersuchungen von Kulturverfahren und PCR-Verfahren belegen bei subgingivalen Plaqueproben die Effizienz der molekularbiologischen Methode (Sakamoto et al. 2001, Eick und Pfister 2002).

Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *engl.* Polymerase chain reaction) dient in der klinischen Mikrobiologie der Vervielfältigung bakterieller und viraler DNA. Die Einführung der aus *Thermus aquaticus* isolierten hitzestabilen Taq-DNA-Polymerase hat das Verfahren aufgrund der wiederholten Einsetzbarkeit von Temperaturen bis 95°C deutlich vereinfacht und beschleunigt, außerdem kann diese Polymerase auch DNA-Abschnitte von mehr als 400 Basenpaaren synthetisieren (Saiki et al. 1988).

Die Temperaturen um 95°C werden für die DNA-Denaturierung benötigt, während die Anlagerung (*engl.* annealing) der Primer bei Temperaturen um 55°C stattfindet. Diese auf einen Genabschnitt gerichteten spezifischen Oligonukleotide bestehen aus ungefähr 18 bis 30 Nukleotiden und bereiten als Startsequenz für die Taq-Polymerase die eigentliche DNA-Synthese vor (Mülhardt 2002). Die Taq-Polymerase synthetisiert die DNA nur in 5'-3'-Richtung bei 72°C (Ashimoto et al. 1996). 30 bis 35 Zyklen ergeben bereits eine ausreichende Menge an DNA, die mit DNA-Fluoreszenzfarbstoffen in einer Gelelektrophorese nachgewiesen werden kann (Saiki et al. 1988).

Für den Nachweis bakterieller Spezies dienen Gene, die einen hohen Grad an spezifischen und konservativen Basensequenzen besitzen. Bewährt hat sich hierbei die Analyse des 16S rRNA-Gens (Ashimoto et al. 1996).

Die konventionelle PCR gestattet keine zuverlässige Quantifizierung der DNA in der Plateauphase, da die Zunahme von DNA-Amplifikat in den späten PCR-Zyklen einen vollständigen Wirkungsverlust der DNA-Polymerase verursacht (Kainz 2000). Allein anhand des qualitativen Nachweises von *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* oder *C. rectus* ist eine mikrobiologische Unterscheidung von chronischer und aggressiver Parodontitis nicht möglich (Mombelli et al. 2002).

Real-time PCR

Die Real-time PCR trifft neben der qualitativen auch eine quantitative Aussage. Die Menge der vervielfältigten DNA wird im Gegensatz zur konventionellen PCR nicht erst in der Plateauphase, sondern bereits in der exponentiellen Phase bestimmt (Corbett 2000). Dieses molekularbiologische Verfahren eignet sich zum schnellen Nachweis und zur Quantifizierung parodontopathogener Bakterien (Sakamoto et al. 2001). Dabei bedient sich auch die Real-time

PCR – wie die konventionelle PCR – der Primer, Nukleotide und der Taq-Polymerase zur DNA-Amplifikation. Zusätzlich benötigt das Verfahren bereits während der Synthese der Genabschnitte einen DNA-Fluoreszenzfarbstoff, dessen optisch messbare Intensität der Menge der vorhandenen DNA im jeweiligen Zyklus entspricht.

Als vorteilhaft erweist sich bei der Real-time PCR die präzise und reproduzierbare Quantifizierung der Gesamtbakterienzahl. Diese ermöglicht eine Interpretation der bakteriellen Belastung parodontaler Taschen und lässt sich als klinisch aussagekräftiger Parameter bei einer Re-Evaluation erneut kontrollieren (Sixou 2003). Die Technik der Real-time PCR eignet sich zur Quantifizierung von Bakterienspezies durch ihre hohe Spezifität und Sensitivität (Socransky und Haffajee 2005).

Mit PCR-Verfahren gelingt auch der Nachweis nicht vitaler Bakterien. So ergibt die Quantifizierung mit der Real-time PCR eine höhere Bakterienzahl im Vergleich mit Kulturverfahren (Sakamoto et al. 2001).

3 Zielstellung

Ziel der Studie war die Etablierung eines quantitativen molekularbiologischen Nachweisverfahrens mittels Real-time PCR für parodontopathogene Spezies und deren Virulenzfaktoren. Die Real-time PCR sollte anschließend bei 125 Plaqueproben angewandt und die Ergebnisse mit einer konventionellen PCR (microDent[®]) und den Kulturverfahren verglichen werden. Neben dem quantitativen Bakteriennachweis der parodontopathogenen Erreger *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *S. constellatus*, *C. rectus*, *F. nucleatum*, der Analyse der *Treponema sp.* und der Gesamtzahl der Bakterien sollten gezielt alle *A. actinomycetemcomitans*-positiven Proben auf das Vorhandensein des Leukotoxins und alle *P. gingivalis*-positiven Proben hinsichtlich des Fimbriellens *fimA* Typ II untersucht werden.

Nach dem Vorliegen der mikrobiologischen Ergebnisse waren die Plaqueproben hinsichtlich bestimmter wiederkehrender bakterieller Komplexe zu analysieren und auch mögliche Zusammenhänge zwischen den zu den Proben bekannten klinischen Parametern und dem Auftreten bestimmter Bakterienspezies zu beschreiben. Weiterhin sollten die Unterschiede der Mikroflora von Parodontitispatienten vor Parodontaltherapie und Parodontitispatienten nach nicht dauerhaft erfolgreicher Therapie untersucht werden.

4 Material und Methoden

4.1 Etablierung der Real-time PCR

Primer

Zunächst erfolgte in Vorbereitung der Real-time PCR eine Literaturrecherche zur Bestimmung geeigneter Primer. Der qualitativ und quantitativ zu führende Bakteriennachweis wurde dabei auf die Primer zur Amplifikation bakterienspezifischer 16S rDNA-Abschnitte ausgerichtet. Nach Literaturstudium erwiesen sich die von Ashimoto et al. (1996) beschriebenen Primer für *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *C. rectus*, *P. intermedia*, *T. denticola* und die Primer zur Bestimmung der Gesamtbakterienzahl als geeignet. Ebenfalls wurden Literaturangaben für Primer zum Nachweis von *F. nucleatum* (Fouad et al. 2002), *S. constellatus* (Jacobs et al. 1996) und den *Treponema sp.* (Paster et al. 2001) genutzt.

Bei *A. actinomycetemcomitans*-positiven Proben erfolgte der Nachweis des Leukotoxingens gemäß den Angaben von Goncharoff et al. (1993). *P. gingivalis*-positive Proben wurden entsprechend den Angaben von Amano et al. (1999) auf das Vorkommen des Fimbrillinen *fimA* Typ II untersucht. Die Primer, die Länge des zu synthetisierenden DNA-Abschnittes und die Literaturangaben werden nachfolgend tabellarisch aufgeführt (Tabelle 1).

Die Synthese und Bereitstellung der Primer erfolgte durch das Institut für Virologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Die optische Dichte war für jeden Primer in der gelieferten Lösung bekannt, daher konnte die erforderliche Konzentration der Primer in der PCR jeweils vorbereitet werden. Anschließend fand die Lagerung der Primer bei -20°C statt.

Tabelle 1

Übersicht zu den verwendeten Primern zum qualitativen Bakteriennachweis mittels konventioneller PCR und quantitativen Bakteriennachweis mittels Real-time PCR

Primerpaare (<i>forward</i> und <i>reverse</i>)	Basenposition und Länge des Amplifikates	Quelle
<i>A. actinomycetemcomitans</i> 5'-AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC 5'-ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT	478-1034 (557)	Ashimoto et al. 1996
<i>P. gingivalis</i> 5'-AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC 5'-ATA GCA TGC CAA CTT GAC	729-1132 (404)	Ashimoto et al. 1996
<i>P. intermedia</i> 5'-TTT GTT GGG GAG TAA AGC AGC GGG 5'-TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T	458-1032 (575)	Ashimoto et al. 1996
<i>T. forsythia</i> 5'-GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA 5'-TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T	120-760 (641)	Ashimoto et al. 1996
<i>T. denticola</i> 5'-TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T 5'-TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA	193-508 (316)	Ashimoto et al. 1996
<i>S. constellatus</i> 5'-GTG CAA GAG CAT CAC TAC C 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC CTT TAC GCC CAR TRA WTC	213-575 (363)	Jacobs et al. 1996
<i>C. rectus</i> 5'-TTT CGG AGC GTA AAC TCC TTT TC 5'-TTT CTG CAA GCA GAC ACT CTT	415-1012 (598)	Ashimoto et al. 1996
<i>F. nucleatum</i> 5'-AGA GTT TGA TCC TGG TCC T 5'-GTC ATC GTG CAC ACA GAA TTG CTG	48-407 (360)	Fouad et al. 2002
<i>Treponema sp.</i> 5'-GAG AGT TTG ATY MTG GCT CAG 3'-GTT ACG ACT TCA CCC TCC T	7-1503 (1497)	Paster et al. 2001
<i>Gesamtzahl der Bakterien (unspezifische 16S rDNA-Primer)</i> 5'-GAT TAG ATA CCC TGG TAG TCC AC 5'-CCC GGG AAC GTA TTC ACC G	786-1387 (602)	Ashimoto et al. 1996
<i>Leukotoxigenen von A. actinomycetemcomitans</i> 5' GGA ATT CCT AGG TAT TGC GAA ACA ATT TGA TC 5' GGA ATT CCT GAA ATT AAG CTG GTA ATC	1974-2235 (262)	Goncharoff et al. 1993
<i>Fimbrillengen fimA Typ II von P. gingivalis</i> 5'-ACA ACT ATA CTT ATG ACA ATG G 5'-AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A	1081-1337 (257)	Amano et al. 1999

Verwendete Bakterienstämme und Plaqueproben

Für die Etablierung der Real-time PCR wurden im Vorfeld klonale Stämme der parodontopathogenen Spezies zur Untersuchung der Primerspezifität in einer konventionellen PCR genutzt. Im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena lagen dabei die Stämme von *A. actinomycetemcomitans* Y4, *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. intermedia* ATCC 25611, *T. forsythia* ATCC 43037, *T. denticola* ATCC 35405, *S. constellatus* ATCC 27513, *C. rectus* ATCC 33238 und *F. nucleatum* ATCC 25586 vor.

Bei der Kultivierung kamen Columbia-Agar (Oxoid, Basingstoke, Grossbritannien) mit 8% Schafsblut, Schaedler-Agar (Oxoid, Basingstoke, Grossbritannien) und TSBV-Agar nach Slots (1982) zur Anwendung. Der Columbia-Agar wurde bei 37°C und 5% CO₂ 48 Stunden inkubiert. Der Schaedler-Agar wurde bei 37°C unter anaeroben Bedingungen zehn Tage inkubiert. Die Inkubationszeit bei TSBV-Agar betrug sieben Tage bei 5% CO₂ und 37°C.

Konventionelle PCR

Die konventionelle PCR sollte die Funktionsfähigkeit der Primer überprüfen und wurde daher auf die Untersuchung klonaler Stämme parodontopathogener Spezies und ausgesuchter klinischer Plaqueproben mit bereits bekannten mikrobiologischen Ergebnissen ausgerichtet. Dazu musste die DNA der parodontopathogenen Bakterien und der Plaqueproben isoliert werden.

Die DNA-Extraktion fand mit dem High-Pure-PCR Template Preparation Kit® (Roche, Mannheim, Deutschland) statt. Zunächst erfolgte die Herstellung einer Bakteriensuspension der jeweiligen Spezies. Die entsprechenden Bakterienkolonien wurden steril von der Agarplatte entnommen und in 1 ml Phosphate Buffered Saline (PBS) suspendiert. Anschließend wurde die noch inhomogene Bakteriensuspension vorsichtig geschüttelt und durch Vortexen eine sichtbare Homogenisierung der Bakterien erreicht. Anschließend erfolgte das Zentrifugieren bei 10 000 U/min in einer Tischzentrifuge, danach wurden 200 µl Lysepuffer hinzugegeben und die Lösung kurz zentrifugiert. Nach Zugabe von 40 µl Proteinase K-Puffer wurde die Lösung unter Schütteln bei 72°C für zehn Minuten inkubiert, anschließend erfolgte ein erneutes Zentrifugieren. Die Lösung wurde auf dem Vortex nach Hinzufügen von 200 µl Bindungspuffer durchmischt. Der nächste Schritt beinhaltete die Inkubation bei 95°C für fünf Minuten. Danach wurden 100 µl Isopropanol p.A. zugegeben

und bei 9000 U/min eine Minute zentrifugiert. Abschließend fand bei 72°C ein zweifaches Waschen der Säulen mit Waschpuffer und das Eluieren der DNA mit Eluations-Puffer statt. Die extrahierte DNA konnte nun in die konventionelle PCR zum Testen der Primer eingesetzt werden, die Aufbewahrung erfolgte in Eppendorf-Röhrchen bei -20°C.

Zur Durchführung der PCR wurden die DNA-Extrakte aufgetaut, vorsichtig gemischt und 5 µl Template-DNA entnommen.

Die PCR-Amplifikation erfolgte in Eppendorf-Röhrchen mit 50 µl Reaktionsvolumen, bestehend aus 45 µl Mastermix und 5 µl DNA. Der Mastermix setzte sich aus 5 µl Forward-Primer (10 pmol/µl), 5 µl Reverse-Primer (10 pmol/µl), 5 µl 2mMol dNTP-Mix (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen), 5 µl 10-fach PCR-Puffer (MBI Fermentas), 5 µl 25 mMol MgCl₂ (Endkonzentration 2,5 mMol) und 1,25 U Taq-Polymerase (MBI Fermentas) sowie dH₂O ad 45 µl zusammen. Alle Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten 45 µl Mastermix, denen 5 µl dH₂O anstelle der DNA hinzugegeben wurden. Um ein Verdampfen der Lösung während der PCR zu verhindern, wurden 30 µl Mineralöl in jedes Eppendorf-Röhrchen gegeben.

Anschließend konnte die konventionelle PCR im TRIO[®]-Thermoblock, (Biometra, Göttingen, Deutschland) gemäß folgendem PCR-Protokoll realisiert werden: Auf den einleitenden Denaturierungsschritt bei 95°C für fünf Minuten folgten zehn Zyklen mit einer Denaturierung bei 95°C für 30 s, sowie das Annealing der Primer und DNA-Amplifikation bei 72°C für zwei Minuten. Danach begannen 20 Zyklen mit der Denaturierung bei 95°C für zehn Sekunden, der Primeranlagerung bei 55°C für 30 s und der DNA-Verlängerung bei 72°C für 30 s. Auf den letzten Zyklus folgte die abschließende Elongation bei 72°C für acht Minuten.

Für den Nachweis der DNA-Amplifikation diente die Gelelektrophorese auf der Grundlage eines zweiprozentigen Agarosegels. Dessen Anfertigung fand durch Erhitzen von 3 g Agarose in 150 ml Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) statt. Anschließend wurden 2,5 µl Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green I (Bio-Rad, Eugene, Oregon, USA) hinzugegeben und das Gel in eine Gelkammer mit 15 Slots gegossen. Aus den Eppendorf-Röhrchen wurden jeweils 5 µl Amplifikat entnommen und zusammen mit 3 µl Farbstoff Orange G als

Laufkontrolle (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, New Jersey, USA) vorsichtig vermischt und in einen Slot eingebracht. Als Kontrolle der amplifizierten DNA-Abschnitte wurde ein DNA-Marker mitgeführt, als Laufpuffer diente TBE-Puffer. Anschließend konnte die Elektrophorese bei 180 V durchgeführt werden. Nach erfolgter Auftrennung der Amplifikate wurde das Gel unter einem UV-Transilluminator betrachtet und fotografiert. Nun konnte die qualitative Auswertung der Amplifikation erfolgen. Ein positives Ergebnis für die eingesetzten Primer wurde festgestellt, wenn die zu erwartenden spezifischen DNA-Banden im Vergleich der Proben die gleiche Position hatten und im Molekulargewicht mit dem Marker übereinstimmten.

Real-time PCR

Die technische Umsetzung der Real-time PCR fand mit dem Thermocycler Rotor-Gene 2000 (Corbett, Sydney, Australien) statt. Zunächst wurden die in der konventionellen PCR getesteten Primer anhand der DNA-Extrakte der Bakterienstämme sowie den Einzelproben mit bekannten mikrobiologischen Ergebnissen auf ihre Funktionsfähigkeit überprüft.

Die Real-time PCR wird allgemein durch die Messung der DNA-Menge in „Echtzeit“ charakterisiert, welche nur mit einem im Reaktionsgefäß befindlichen DNA-spezifischen Farbstoff umgesetzt werden kann. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green I lagert sich an die doppelsträngige DNA (Corbett 2000). Erreicht die im Karussell befindliche Probe den Detektor, wird in der Probe an doppelsträngige DNA gebundenes SYBR[®] Green I bei $\lambda = 470$ nm zur Fluoreszenz angeregt und die Emission bei $\lambda = 510$ nm digital gemessen (Corbett 2000).

Bei korrekter Amplifikation ergeben sich exponentielle Wachstumsraten der DNA-Amplifikate, die sich durch eine überproportionale Zunahme der Fluoreszenzsignale nachweisen lassen. Die Abbildung 1 zeigt die farblich markierten Graphen der einzelnen Proben und die mit der Amplifikation verbundene Steigerung der Fluoreszenzsignale (Abb. 1).

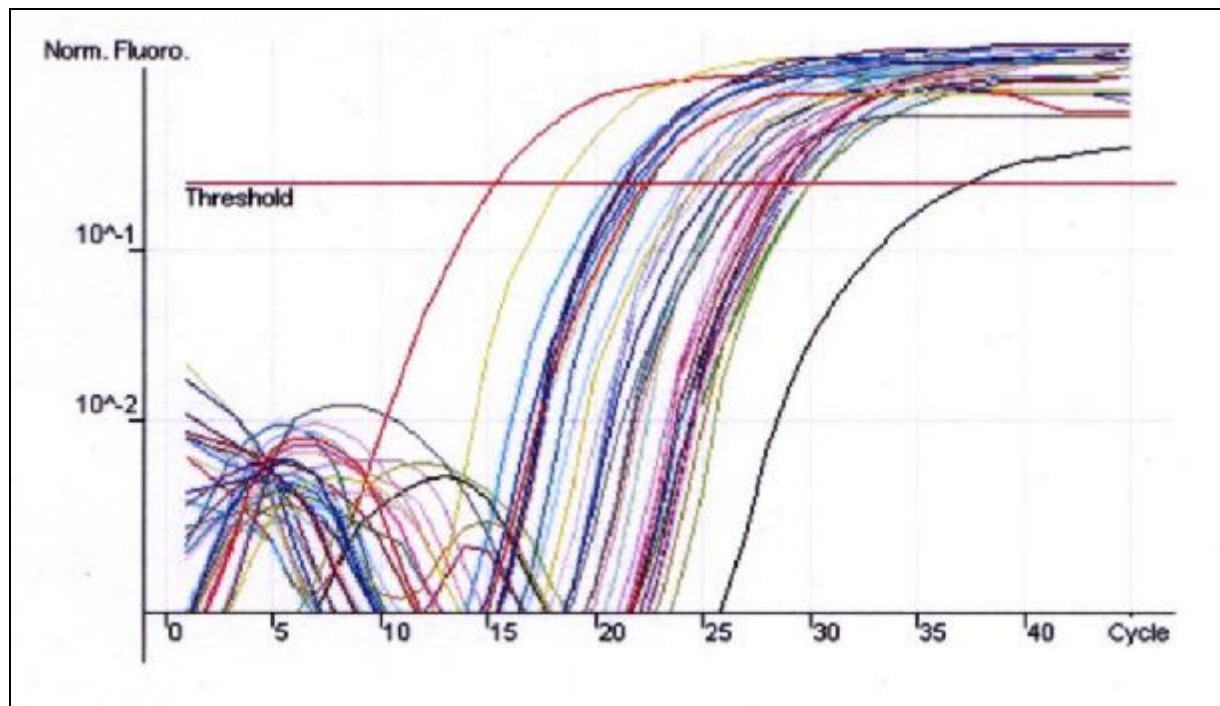


Abbildung 1

Grafische Darstellung der in der Real-time PCR erhaltenen Fluoreszenzsignale (Norm. Fluoro.) in Abhängigkeit von der Zyklenanzahl (Cycle) und Vorbereitung der Quantifizierung der Signale durch Einsatz einer Nachweisschwelle (Threshold).

Für die Real-time PCR wurden Eppendorf-Röhrchen mit einem Reaktionsgemisch von 20 µl verwendet, bestehend aus 2 µl DNA und 18 µl Mastermix. Der Mastermix setzte sich aus 1 µl Forward-Primer, 1 µl Reverse-Primer, 2 µl 2 mMol dNTP-Mix, 2 µl 25 mMol MgCl₂, 2 µl 10-fach PCR-Puffer, 1 U Taq-Polymerase, 1 µl SYBR[®] Green I und 8 µl dH₂O zusammen. Dabei lag SYBR[®] Green I in einer 10 000-fachen Konzentration vor und musste zunächst auf 1:500 verdünnt werden (20-fache Konzentration).

Mit dem Rotor-Gene 2000 konnten in einem PCR-Durchlauf im Probenkarussell 36 Proben untersucht werden, darunter waren maximal 32 klinische Proben. Desweiteren wurden eine Verdünnungsreihe der untersuchten Bakterienspezies von 10⁷ bis 10³ als Standard mitgeführt ergänzt durch eine Negativkontrolle bestehend aus 18 µl Mastermix und 2 µl dH₂O. Die anderen Tubes enthielten jeweils 18 µl Mastermix und 2 µl DNA.

Nach Einbringen der Eppendorf-Röhrchen in das Karussell wurde die Programmierung der PCR durchgeführt. Auf den einleitenden Denaturierungsschritt bei 94°C für fünf Minuten folgten 45 Zyklen, beginnend mit der Denaturierung bei 94°C für 15 s, der Anlagerung der

Primer an die Einzelstrang-DNA 20 s bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen und der Polymerisation der DNA bei 72°C und 20 s, wobei die Dauer für das Fimbrilligen Typ II auf 30 s und für das Leukotoxingen auf 25 s erhöht wurde. Die Annealing-Temperaturen betrugen 60°C für *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *C. rectus*, *F. nucleatum* und die *Treponema species*. Für *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, die Gesamtbakterien und das Fimbrilligen Typ II wurde das Annealing bei 58°C eingerichtet, für *S. constellatus* bei 57°C, und für das Leukotoxingen bei 55°C.

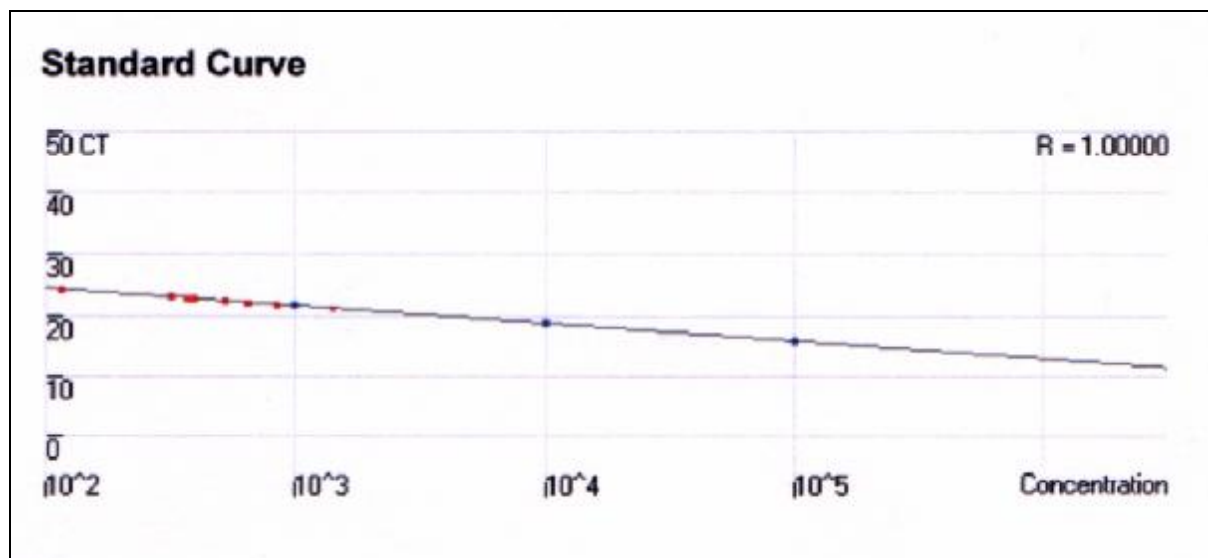


Abbildung 2
Beispielgraph einer durch Schmelzkurvenanalyse ermittelten Standardkurve bei der Real-time PCR mit Rotor-Gene 2000

Nach den 45 Zyklen fand die vollständige Dimerisierung der Amplifikate bei 40°C innerhalb von zwei Minuten statt, anschliessend wurden die Proben auf 99°C erhitzt und dabei die Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Aus den gewonnenen Daten konnte eine Standardkurve ermittelt werden (Abb. 2). Die Schmelzkurvenanalyse der Real-time PCR ergab die gewünschten Informationen über die ursprüngliche Quantität der in den Proben untersuchten DNA.

Die berechneten DNA-Konzentrationen wurden in Beziehung zur mitgeführten Verdünnungsreihe gesetzt. Eine Einteilung in die Klassen von $< 10^3$ bis $\geq 10^7$ diente der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse:

- Klasse negativ / $< 10^3$
- Klasse 10^3
- Klasse 10^4
- Klasse 10^5
- Klasse 10^6
- Klasse $\geq 10^7$.

4.2 Anwendung der Real-time PCR bei subgingivalen Plaqueproben

Probenmaterial und klinische Daten

Mittels der etablierten Real-time PCR wurde nun eine mikrobiologische Analyse subgingivaler Plaqueproben von Parodontitispatienten und supragingivaler Plaqueproben von parodontal gesunden Personen durchgeführt. Es handelte sich dabei um DNA-Extrakte von 113 subgingivalen Plaqueproben, die von Parodontitispatienten stammten, und 12 supragingivalen Plaqueproben von parodontal gesunden Personen. Die DNA-Extrakte lagen im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena vor und wurden in einer zahnärztlichen Praxis von Dr. Freyer, Bünde, im Rahmen einer Studie zur Bewertung des IL-1-Genotyps entnommen (Freyer 2003).

Zu den in diese Studie eingeschlossenen Patienten existierten die Daten zu den klinischen Parametern BOP, API, dem klinische Attachmentverlust und der Sondierungstiefe.

Die Aufteilung des Patientenkollektivs erfolgte in drei Gruppen.

- In der ersten Gruppe waren 19 Patienten, die für eine systematische Parodontitistherapie vorgesehen waren (68 Proben).
- Die zweite Gruppe umfasste 13 Patienten mit einer chronischen Parodontitis, welche nicht erfolgreich therapiert worden war (45 Proben).
- Die dritte Gruppe setzte sich aus zwölf parodontal gesunden Probanden zusammen (zwölf Proben).

Voraussetzung für die Aufnahme in eine der oben genannten Gruppen war die Erfüllung mehrerer klinischer Kriterien: Im Zahnsystem mussten mindestens 20 eigene, in Funktion befindliche Zähne vorhanden sein. Der API betrug weniger als 25%. Das Lebensalter sollte zwischen 35 und 55 Jahren liegen. Eine Schwangerschaft war auszuschliessen. Außerdem durften schwere Allgemeinerkrankungen und Stoffwechselerkrankungen, wie Diabetes mellitus, nicht vorliegen. Antibiotika sollten in den letzten drei Monaten vor dem Untersuchungsbeginn nicht eingenommen worden sein. Grundsätzlich nicht in die Studie einbezogen wurden Raucher. Bei den parodontal gesunden Personen war ein BOP-Index < 10% Voraussetzung. Die Sondierungstiefen durften im Bereich der ersten Molaren zwei Millimeter nicht überschreiten (Freyer, 2003).

Wesentliche Kriterien für eine chronische Parodontitis waren Blutung bei Sondieren (BOP), Zahnlockerung, das Vorkommen von Zahnfleischtaschen, eine Rötung der Gingiva sowie ein Attachmentverlust. Die Sondierung der Taschen wurde nach der Vierpunktmethode (distal, vestibulär, mesial, palatinal bzw. lingual) durchgeführt. Als Maß für den Attachmentverlust galt die Differenz zwischen Schmelz-Zement-Grenze und retrahierter Gingiva (Freyer 2003).

Die mikrobiologische Probenentnahme fand prinzipiell vor Deep scaling und Root planing statt. Sie wurde am tiefsten Punkt der Tasche durchgeführt, nach Möglichkeit der klinischen Situation sollten Taschen mit unterschiedlichen Sondierungstiefen (< 4 mm; 4,5 – 6 mm; 6,5 – 9 mm; > 9 mm) berücksichtigt werden. Die Entnahme der Plaqueproben erfolgte mit sterilen endodontischen Papierspitzen aus dem Taschenfundus. Nach Probenentnahme wurde die Vitalität der Bakterien durch das Transportmedium VMGA III nach Dahlen (Dahlen et al. 1993) sowie einen zügigen Transport sichergestellt. Ein Teil der Proben wurde anschließend der DNA-Extraktion zugeführt, während der verbleibende Anteil auf Agarplatten ausgespatelt wurde. Die Aufbewahrung der DNA-Extrakte erfolgte in Eppendorf-Röhrchen bei -20°C.

Die mikrobiologische Diagnostik war mit dem kommerziell erhältlichen microDent®-Kit (Hain Diagnostika, Nehren, Deutschland) durchgeführt worden. Es handelt sich bei diesem DNA-Nachweis um eine 16S rDNA-basierte Multiplex-PCR mit anschließender reverser Hybridisierung. Anhand der Intensität des Farbumschlages auf den Zellulosestreifen erfolgte eine semiquantitative Klassifizierung in die Gruppen negativ / < 10³, 10³, 10⁴ und ≥ 10⁵. Bei den Spezies *F. nucleatum*, *C. rectus* und *S. constellatus* war die Zahl der koloniebildenden Einheiten ermittelt worden. Die quantitative Gruppeneinteilung erfolgte hierbei analog zur

PCR. Bei der Gesamtzahl der Bakterien, der die Zahl der anaeroben KBE zugrunde lag, wurden die Ergebnisse entweder in die Klasse $< 10^6$ oder in die Klasse $\geq 10^6$ eingeordnet (Freyer 2003).

Durchführung der Real-time PCR

Zu den Plaqueproben lagen somit qualitative und quantitative Ergebnisse über die Vorkommen von *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola* nach der Bestimmung mit der microDent[®]-PCR und nach Anwendung der Kulturverfahren für *S. constellatus*, *C. rectus*, *F. nucleatum* sowie die Gesamtzahl der Bakterien vor.

Es wurden in Vorbereitung dieses Methodenvergleiches die DNA-Extrakte systematisch qualitativ und quantitativ mit der Real-time PCR analysiert. Dabei fand zunächst der Nachweis parodontopathogenen Erreger *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *S. constellatus*, *C. rectus*, *F. nucleatum*, die Analyse der *Treponema sp.* und der Gesamtbakterienzahl statt. In einem nachfolgenden PCR-Durchlauf konnten gezielt alle *A. actinomycetemcomitans*-positiven Proben auf das Leukotoxigen und alle *P. gingivalis*-positive Proben hinsichtlich des Vorkommens von Fimbrillinen Typ II untersucht werden (Abb. 3).

Anschließend wurden die Daten der 113 subgingivalen Plaqueproben in Bezug zu den für jede Probe vorliegenden klinischen Parametern gesetzt. Bei dem qualitativ zu führenden Nachweis der Virulenzfaktoren Leukotoxigen und Fimbrillinen Typ II konnten die Ergebnisse den klinischen Parametern gegenübergestellt werden.

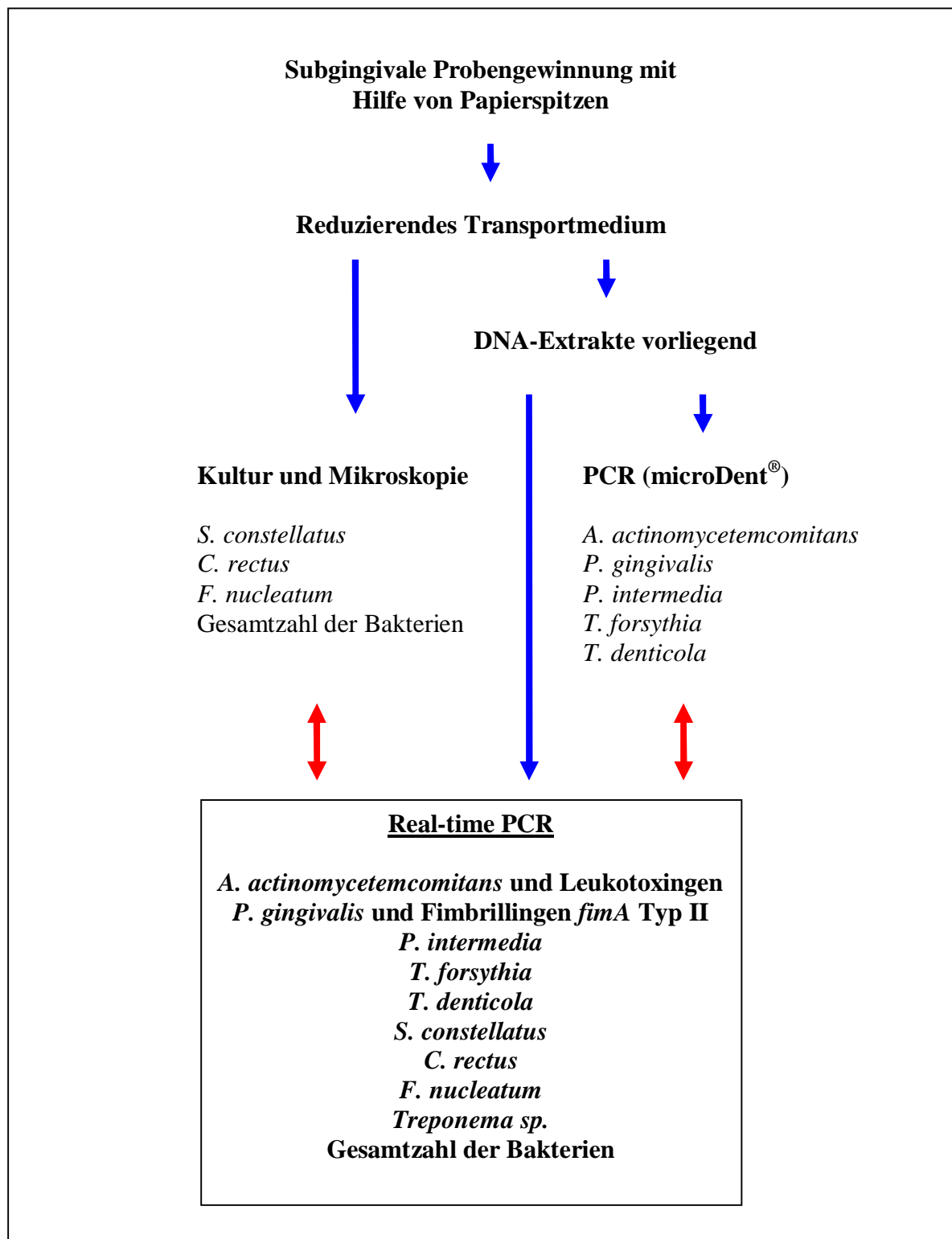


Abbildung 3

Methodisches Vorgehen beim Vergleich der Real-time-PCR mit der konventionellen PCR (microDent®) sowie den Kulturverfahren unter Nutzung klinischer Plaqueproben

4.3 Statistische Methoden

Die Ergebnisse der Real-time PCR wurden anschließend mit den vorliegenden Ergebnissen der microDent[®]-PCR und der Kulturverfahren verglichen. Zudem wurden unter Nutzung von Korrelationsbetrachtungen die quantitativen Ergebnisse des Keimnachweises der Real-time PCR und auch die qualitativen Ergebnisse zu den Virulenzfaktoren Fimbrillinen *fimA* Typ II und dem Leukotoxigen in Beziehung zu den klinischen Parametern gesetzt.

Die statistische Auswertung erfolgte unter Nutzung von SPSS, Version 13.0. Mit Hilfe des Programms wurden die Kreuztabellen erstellt. Für Korrelationsbetrachtungen fand der Spearman-Test Anwendung. Die beiden Patientengruppen vor Therapie und ohne Therapieerfolg wurden mittels Mann-Whitney-Test verglichen.

5 Ergebnisse

5.1 Vergleich der Real-time PCR mit konventioneller PCR (microDent[®]) und mit Kulturverfahren

Der Verfahrensvergleich basierte auf der Gegenüberstellung der Ergebnisse für alle Spezies in den Klassen negativ / $< 10^3$, 10^3 , 10^4 und $\geq 10^5$. Da in der Real-time PCR die Möglichkeit bestand, die Ergebnisse für alle Spezies durch Einführung der Klassen 10^6 und $\geq 10^7$ genauer zu quantifizieren, wurden die Real-time PCR-Klassen 10^5 , 10^6 und $\geq 10^7$ eingerichtet. Im Vergleich von Real-time PCR und konventioneller PCR (microDent[®]) wurden daher für die Spezies *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* und *T. denticola* die Real-time PCR-Klassen 10^5 , 10^6 und $\geq 10^7$ gemeinsam dem Ergebnis der konventionellen PCR in der Klasse $\geq 10^5$ gegenübergestellt.

Der Verfahrensvergleich der Real-time PCR mit den Kulturverfahren für die Erreger *S. constellatus*, *C. rectus* und *F. nucleatum* wurde auf die gleiche Weise vollzogen. Die Klasseneinteilung der Kulturverfahren war den Bedingungen der microDent[®]-PCR angepasst worden, daher fand der Vergleich der Ergebnisse in den vier Klassen statt. Nur bei der Gesamtzahl der Bakterien erfolgte eine vereinfachte Unterscheidung der Proben mit Keimzahlen $< 10^6$ bzw. $> 10^6$.

Actinobacillus actinomycetemcomitans

Beide Verfahren ordneten übereinstimmend 78 Proben unterhalb der Nachweisschwelle von $< 10^3$ ein (Tabelle 2). Davon abweichend fanden in der Real-time PCR weitere zehn Proben Eingang in diese Klasse, während die konventionelle PCR weitere 26 Proben als negativ einordnete. Bei den Keimzahlen 10^3 konnte eine Übereinstimmung in zwei Proben, bei 10^4 in drei Proben erzielt werden. Aus Sicht der konventionellen PCR wurde bei den Keimzahlen $\geq 10^5$ ein gemeinsames Ergebnis erzielt, welches in der Real-time PCR allerdings der Klasse $\geq 10^7$ zugeordnet wurde. Deutliche Abweichungen beider Verfahren waren bei fünf Proben feststellbar. Zwei Proben lagen in der Real-time PCR unter der Nachweisgrenze, erreichten hingegen in der konventionellen PCR die Klasse $\geq 10^5$. Bei drei Proben wurden in der Real-time PCR Keimzahlen von 10^5 bzw. 10^6 festgestellt, die sich in der konventionellen PCR unterhalb der Nachweisgrenze befanden (Tabelle 2). Die Korrelationsbetrachtung beider Verfahren mittels Spearman-Test ergab eine hochsignifikante Korrelation ($p < 0,01$).

Tabelle 2

Kreuztabelle für *A. actinomycetemcomitans* zum Vergleich der quantitativen Ergebnisse der Real-time PCR mit den Daten der microDent®-PCR

<i>A. actino- mycetemcomitans</i>	Real-time PCR						
PCR (microDent®)	neg./ < 10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	≥ 10 ⁷	Gesamt
neg./ < 10 ³	78	17	6	2	1	0	104
10 ³	5	2	1	1	0	1	10
10 ⁴	3	1	3	1	0	0	8
≥ 10 ⁵	2	0	0	0	0	1	3
Gesamt	88	20	10	4	1	2	125

Porphyromonas gingivalis

Bei dieser Spezies zeigten sich Übereinstimmungen beider Verfahren hinsichtlich der Nachweisschwelle (< 10³) mit 32 Proben, bei den Keimzahlen 10³ mit 15 Proben und bei der Klasse > 10⁵ mit zehn Proben. Eine Übereinstimmung lag auch in der Klasse 10⁴ mit sechs Proben vor (Tabelle 3).

Tabelle 3

Kreuztabelle für *P. gingivalis* zum Vergleich der quantitativen Ergebnisse der Real-time PCR mit den Daten der microDent®-PCR

<i>P. gingivalis</i>	Real-time PCR						
PCR (microDent®)	neg./ < 10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	≥ 10 ⁷	Gesamt
neg./ < 10 ³	32	11	5	1	0	3	52
10 ³	9	15	7	1	1	2	35
10 ⁴	3	5	6	2	2	2	20
≥ 10 ⁵	1	3	4	4	5	1	18
Gesamt	45	34	22	8	8	8	125

Bei 13 Proben befanden sich die Ergebnisse der Real-time PCR gegenüber der konventionellen PCR unter der Nachweisschwelle. Eine dieser Proben erreichte in der microDent®-PCR die Klasse ≥ 10⁵. In der Real-time PCR lagen 20 Proben oberhalb der Nachweisschwelle, erreichten diese in der konventionellen PCR jedoch nicht. Von diesen 25

Proben befand sich die Mehrheit in der Klasse 10^3 (elf Proben), nur vier Proben wurden in der Real-time PCR in Keimzahlklassen 10^5 , 10^6 bzw. $\geq 10^7$ eingeordnet. Es ergab sich eine hochsignifikante Korrelation ($p < 0,01$) beider PCR-Verfahren.

Prevotella intermedia

Eine Übereinstimmung beider Verfahren lag bei 33 Proben in der Klasse $< 10^3$ vor (Tabelle 4). Die microDent[®]-PCR ordnete dieser Klasse weitere 42 Proben zu, die Real-time PCR hingegen 21 Proben. Stärkere Abweichungen zeigten die Klassen 10^3 und 10^4 , hier gab es bei zwei bzw. vier Proben exakte Übereinstimmungen. Bei den Klassen $\geq 10^5$ lagen in der Real-time PCR mit 30 Proben doppelt so viele positive Proben wie in der konventionellen PCR vor. Gemeinsam nachgewiesen werden konnten aus Sicht der konventionellen PCR in der Klasse $\geq 10^5$ sieben Proben. Der statistische Vergleich von Real-time PCR und konventioneller PCR erbrachte bei *P. intermedia* insgesamt eine mäßige Übereinstimmung ohne signifikante Korrelation beider Verfahren.

Tabelle 4

Kreuztabelle für *P. intermedia* zum Vergleich der quantitativen Ergebnisse der Real-time PCR mit den Daten der microDent[®]-PCR

<i>P. intermedia</i>	Real-time PCR						
PCR (microDent [®])	neg./ $< 10^3$	10^3	10^4	10^5	10^6	$\geq 10^7$	Gesamt
neg./ $< 10^3$	33	8	20	12	2	0	75
10^3	6	2	2	4	1	0	15
10^4	10	2	4	2	2	0	20
$\geq 10^5$	5	0	3	1	2	4	15
Gesamt	54	12	29	19	7	4	125

Tannerella forsythia

Mehrfache Übereinstimmungen erzielten die PCR-Verfahren im quantitativen Nachweis dieser Spezies. Gemeinsam wurden 16 Proben unterhalb der Nachweisschwelle eingeordnet, abweichend davon gehörten in der Real-time PCR neun weitere Proben dieser Klasse an, in der konventionellen PCR jedoch 32 Proben (Tabelle 5).

Tabelle 5

Kreuztabelle für *T. forsythia* zum Vergleich der quantitativen Ergebnisse der Real-time PCR mit den Daten der microDent®-PCR

<i>T. forsythia</i>	Real-time PCR						
PCR (microDent®)	neg./ < 10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	≥ 10 ⁷	Gesamt
neg./ < 10 ³	16	10	9	9	3	1	48
10 ³	3	13	9	5	2	1	33
10 ⁴	4	1	4	5	6	10	30
≥ 10 ⁵	2	0	2	0	3	7	14
Gesamt	25	24	24	19	14	19	125

Bei den Keimzahlen der Klasse 10³ ergaben sich für 13 Proben übereinstimmende Ergebnisse. Abweichend davon wurden in der Real-time PCR elf weitere Proben in diese Klasse eingeordnet, in der microDent®-PCR hingegen 20 Proben. Vier Proben zeigten eine Übereinstimmung in der Klasse 10⁴. Während in der microDent®-PCR 26 weitere Proben Eingang in diese Klasse fanden, waren es in der Real-time PCR 20 Proben. Übereinstimmungen lagen aus Sicht der microDent®-PCR in der Klasse ≥ 10⁵ mit zehn Proben vor.

Starke Abweichungen konnten insgesamt bei zwölf Proben festgestellt werden. In der Real-time PCR waren zwei Proben negativ, die in der konventionellen PCR in der Klasse ≥ 10⁵ lagen. Weiterhin befanden sich zehn Proben in der microDent®-PCR unterhalb der Nachweisschwelle, die in der Real-time PCR die Klassen 10⁵, 10⁶ bzw. ≥ 10⁷ erreichten. Mit $p < 0,01$ lag eine hochsignifikante Korrelation beider Verfahren vor.

Treponema denticola

Auch bei dieser Spezies zeigte der Vergleich eine Übereinstimmung der zwei PCR-Methoden mit einer hochsignifikanten Korrelation ($p < 0,01$). Insgesamt 50 Proben wurden gemeinsam als unter der Nachweisschwelle liegend bestimmt. Abweichend davon konnten in der Real-time PCR zusätzlich zehn Proben in diese Klasse eingeordnet werden (Tabelle 6). Weitere 24 Proben befanden sich in microDent®-PCR in der gleichen Klasse, die in der Real-time PCR

oberhalb der Nachweisschwelle eingeordnet wurden. In der Klasse 10^3 zeigten sich bei elf Proben Übereinstimmungen. Darüber hinaus wurden in der Real-time PCR weitere 17 Proben dieser Klasse zugewiesen, ihre Zahl lag hingegen in der microDent[®]-PCR bei 19 Proben.

In der Klasse 10^4 konnte bei vier Proben eine Übereinstimmung festgestellt werden. Aus Sicht der microDent[®]-PCR ergaben sich in der Klasse $\geq 10^5$ bei fünf Proben gemeinsame Ergebnisse. Dabei betrugen die verfahrensbedingten Abweichungen bei der Real-time PCR 15 Plaqueproben und zwei Proben bei der konventionellen PCR.

Tabelle 6

Kreuztabelle für *T. denticola* zum Vergleich der quantitativen Ergebnisse der Real-time PCR mit den Daten der microDent[®]-PCR

<i>T. denticola</i>	Real-time PCR						
PCR (microDent [®])	neg./ $< 10^3$	10^3	10^4	10^5	10^6	$\geq 10^7$	Gesamt
neg./ $< 10^3$	50	14	7	2	1	0	74
10^3	8	11	4	4	2	1	30
10^4	2	3	4	2	1	2	14
$\geq 10^5$	0	0	2	2	1	2	7
Gesamt	60	28	17	10	5	5	125

Streptococcus constellatus

Die Real-time PCR zeigte bei *S. constellatus* eine Übereinstimmung mit den Kulturverfahren in mehreren Klassen. So konnten 55 Proben gemeinsam als unterhalb der Nachweisschwelle liegend bestimmt werden (Tabelle 7). Bei den Kulturverfahren wurden zusätzlich 55 Proben dieser Klasse zugeordnet, bei der Real-time PCR hingegen nur fünf Proben. Insgesamt wurde eine große Anzahl von Proben in der Kultur unterhalb der Nachweisschwelle eingeordnet. Eine signifikante Korrelation beider Verfahren für den Nachweis von *S. constellatus* konnte statistisch nicht ermittelt werden.

In der Klasse 10^4 ergaben sich bei sechs Proben Übereinstimmungen. Abweichend davon ordnete die Real-time PCR dieser Klasse weitere 21 Proben zu, die Kultur hingegen sechs Proben. Deutliche Abweichungen zeigten sich bei acht Proben, die in den Kulturverfahren als negativ bestimmt wurden, in der Real-time PCR jedoch die Klassen 10^5 bzw. 10^6 erreichten.

Tabelle 7

Kreuztabelle für *S. constellatus* zum Vergleich der quantitativen Ergebnisse der Real-time PCR mit den Daten der Kulturverfahren

<i>S. constellatus</i>	Real-time PCR						
Kultur	neg./ $< 10^3$	10^3	10^4	10^5	10^6	$\geq 10^7$	Gesamt
neg./ $< 10^3$	55	29	18	7	1	0	110
10^3	0	0	1	0	0	0	1
10^4	5	1	6	0	0	0	12
$\geq 10^5$	0	0	2	0	0	0	2
Gesamt	60	30	27	7	1	0	125

Campylobacter rectus

Auch bei dieser Spezies wurde eine Übereinstimmung der beiden Verfahren in mehreren Klassen festgestellt. Hervorzuheben sind die 22 gemeinsam unterhalb der Nachweisschwelle ($< 10^3$) liegenden Proben. Dem gegenüber gab es in der Kultur 72 weitere Proben dieser Klasse, in der Real-time PCR hingegen fünf weitere Proben (Tabelle 8). In der Klasse 10^3 lagen vier Übereinstimmungen vor, 14 weitere Proben ordneten die Kulturverfahren dieser Klasse zu. In der Real-time PCR waren davon 23 Proben betroffen.

Tabelle 8

Kreuztabelle für *C. rectus* zum Vergleich der quantitativen Ergebnisse der Real-time PCR mit den Daten der Kulturverfahren

<i>C. rectus</i>	Real-time PCR						
Kultur	neg./ $< 10^3$	10^3	10^4	10^5	10^6	$\geq 10^7$	Gesamt
neg./ $< 10^3$	22	21	20	24	5	2	94
10^3	3	4	5	6	0	0	18
10^4	2	2	3	3	1	0	11
$\geq 10^5$	0	0	1	0	1	0	2
Gesamt	27	27	29	33	7	2	125

Ein übereinstimmendes Ergebnis lag aus Sicht der Kultur in der Klassen $\geq 10^5$ vor, insgesamt erreichten zwei Proben in der Kultur diese Klasse. Demgegenüber wurden insgesamt 42 Proben in der Real-time PCR den Klassen 10^5 , 10^6 bzw. $\geq 10^7$ zugeordnet. Starke Abweichungen fanden sich bei 31 Proben, die zu keinem positiven Kulturergebnis führten, in der Real-time PCR jedoch in die Klassen 10^5 , 10^6 bzw. $\geq 10^7$ gelangten. Statistisch lag für *C. rectus* keine signifikante Korrelation vor.

Fusobacterium nucleatum

Bei *F. nucleatum* stimmten in dem Verfahrensvergleich sieben Proben unterhalb der Nachweisschwelle liegend überein. Abweichend davon beschrieb die Real-time PCR in dieser Klasse weitere 13 Proben, die Kultur 45 Proben. Die Kreuztabelle zeigt aus Sicht der Kultur wesentliche Gemeinsamkeiten in den Klassen 10^3 , 10^4 und $\geq 10^5$ mit zwölf, 14 bzw. fünf übereinstimmenden Proben (Tabelle 9).

Stärkere Abweichungen ergaben sich bei elf Proben. Die Kultur wies in der Klasse $\geq 10^5$ drei Proben aus, die in Real-time PCR als negativ bestimmt wurden. Acht Proben erreichten hingegen in der Real-time PCR die Klasse 10^5 , lagen aber in der Kultur unterhalb der Nachweisschwelle. Eine signifikante Korrelation beider Verfahren für *F. nucleatum* konnte statistisch nicht gesichert werden.

Tabelle 9

Kreuztabelle für *F. nucleatum* zum Vergleich der quantitativen Ergebnisse der Real-time PCR mit den Daten der Kulturverfahren

<i>F. nucleatum</i>	Real-time PCR						
Kultur	neg./ $< 10^3$	10^3	10^4	10^5	10^6	$\geq 10^7$	Gesamt
neg./ $< 10^3$	7	22	15	8	0	0	52
10^3	6	12	4	3	0	0	25
10^4	4	10	14	2	5	0	35
$\geq 10^5$	3	2	3	4	1	0	13
Gesamt	20	46	36	17	6	0	125

Gesamtzahl der Bakterien

Bei den Gesamtbakterien ergab sich aufgrund der Unterscheidung der Kulturen mit der Einteilung in KBE $< 10^6$ bzw. $> 10^6$ ein nur eingeschränkt möglicher quantitativer Vergleich (Tabelle 10). In der Real-time PCR wurden 24% der Proben in die Klasse $> 10^6$ eingeordnet, hingegen 76% in die Klasse $< 10^6$. Keine der Proben zeigte in der Real-time PCR Keimzahlen unter der Nachweisschwelle (Tabelle 10).

Tabelle 10

Kreuztabelle für die Gesamtzahl der Bakterien zum Vergleich der quantitativen Ergebnisse der Real-time PCR mit den Daten der Kulturverfahren

Gesamtbakterien	Real-time PCR						
Kultur	neg./ $< 10^3$	10^3	10^4	10^5	10^6	$\geq 10^7$	Gesamt
neg./ $< 10^6$	--	34	18	11	8	2	73
$\geq 10^6$	--	4	12	16	13	7	52
Gesamt	--	38	30	27	21	9	125

In beiden Verfahren erreichten 63 Proben übereinstimmend den quantitativen Bereich $< 10^6$. Aus Sicht der Kultur befanden sich 20 Proben gemeinsam in der Klasse $> 10^6$. Eine signifikante Korrelation konnte statistisch gesichert werden ($p < 0,01$).

5.2 Bakterielle Besiedlung und Auftreten von Virulenzfaktoren in Abhängigkeit von der Sondierungstiefe

Actinobacillus actinomycetemcomitans

Die Sondierungstiefe stand in dieser Studie nicht in Zusammenhang mit dem Auftreten von *A. actinomycetemcomitans*. Auch bei einem Viertel der parodontal gesunden Personen konnte diese Bakterienspezies nachgewiesen werden (Abb. 4, Tabelle 11 im Anhang). Im Vergleich dazu waren erkrankte Parodontien mit geringer Sondierungstiefe (< 4 mm) zu einem Drittel Träger dieser Spezies. Bei den Parodontitispatienten wurde *A. actinomycetemcomitans* in 34 Proben nachgewiesen, bei den parodontal gesunden Personen in drei Proben.

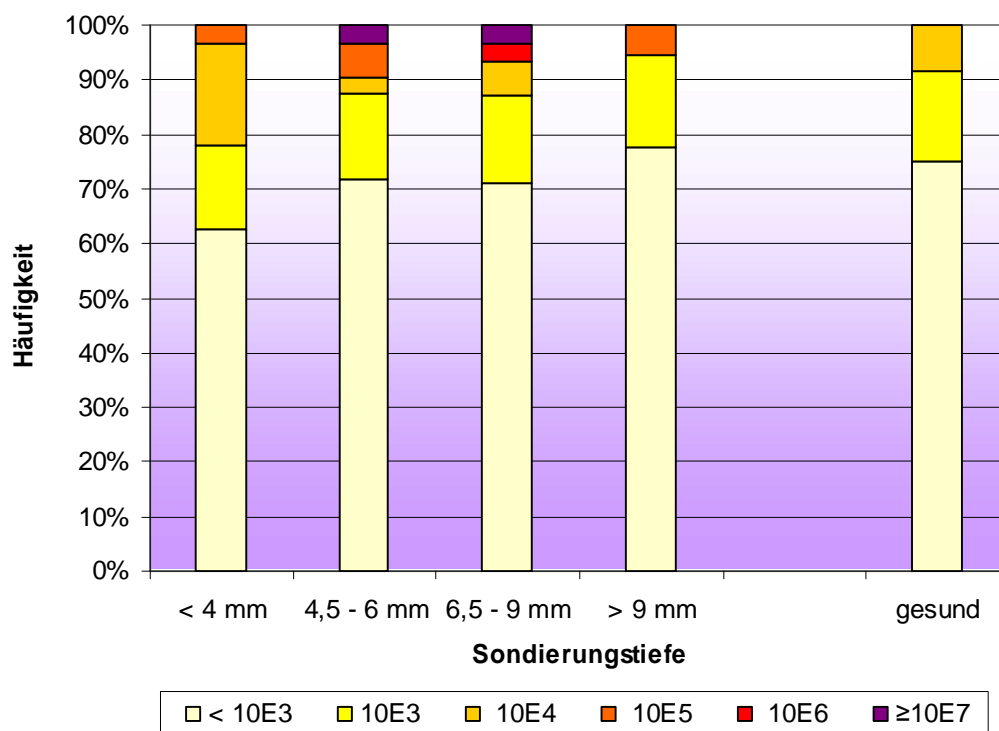


Abbildung 4

Quantitativer Nachweis von *A. actinomycetemcomitans* in Abhängigkeit vom klinischen Parameter Sondierungstiefe

Leukotoxingen

Die Untersuchung der für *A. actinomycetemcomitans* positiven Proben ergab keinen Zusammenhang von Sondierungstiefe und leukotoxin-positiven Proben. Bei den Parodontitispatienten waren insgesamt 13 Proben positiv für das Leukotoxingen. Das einzelne positive Ergebnis bei den parodontal gesunden Personen erklärt sich aus der Tatsache, daß es sich hier um einen Mitarbeiter des Institutes für Medizinische Mikrobiologie handelt, der Umgang mit diesen Keimen hat (Abb. 5, Tabelle 12 im Anhang).

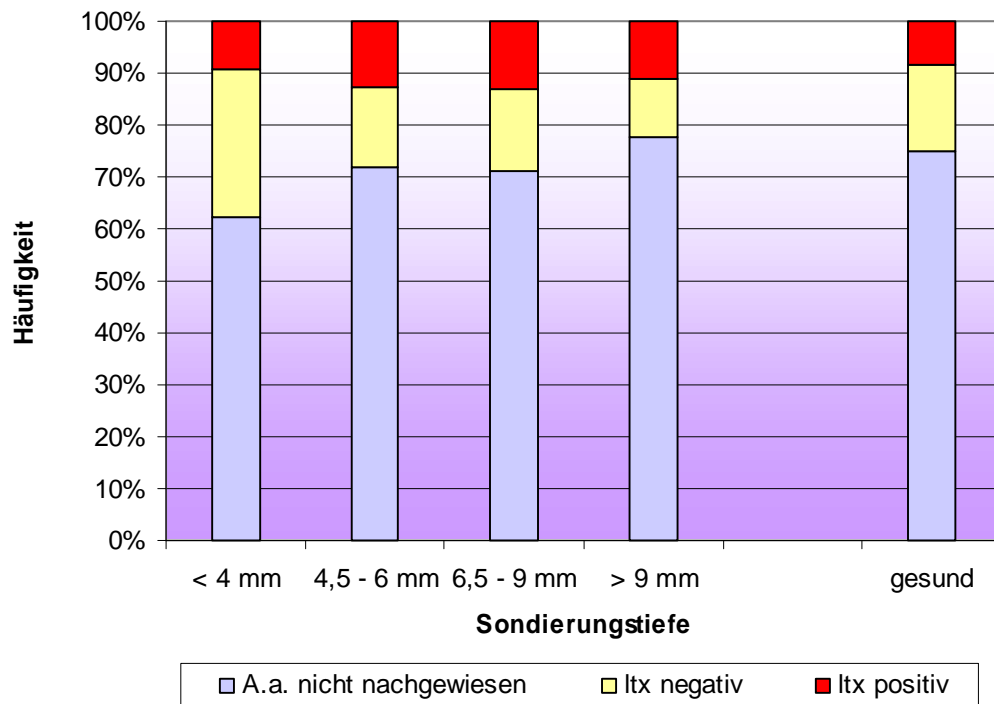


Abbildung 5
Häufigkeit des Nachweises von Leukotoxinen in Abhängigkeit vom klinischen Parameter Sondierungstiefe

Porphyromonas gingivalis

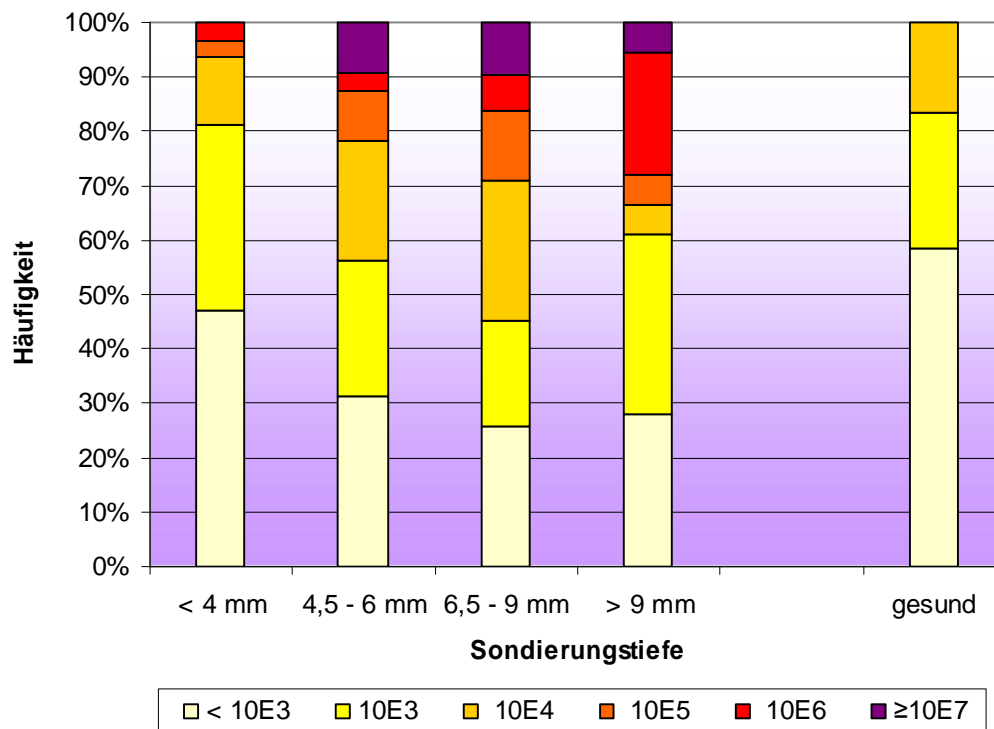


Abbildung 6
Quantitativer Nachweis von *P. gingivalis* in Abhängigkeit vom klinischen Parameter Sondierungstiefe

Für *P. gingivalis* ergab sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen Sondierungstiefe und Bakterienanzahl. Der Leitkeim war bereits bei über der Hälfte der Parodontien mit geringer Sondierungstiefe (< 4 mm) nachweisbar, wurde aber auch bei parodontal gesunden Personen in ungefähr 40% der Proben identifiziert. (Abb. 6, Tabelle 13 im Anhang).

Fimbrilligen fimA Typ II

Die Analyse der Ergebnisse zum Virulenzfaktor Fimbrilligen *fimA* Typ II zeigte eine gewisse Abhängigkeit von der Sondierungstiefe, jedoch wurde *fimA* Typ II auch in flachen Taschen und bei parodontal gesunden Personen nachgewiesen (Abb. 7, Tabelle 14 im Anhang). Von den 74 *P. gingivalis*-positiven Plaqueproben der Patienten waren 44 Proben auch positiv für das Fimbrilligen Typ II. Bei zwei von fünf parodontal gesunden Personen, die für *P. gingivalis* positiv waren, trat ebenfalls *fimA* Typ II auf.

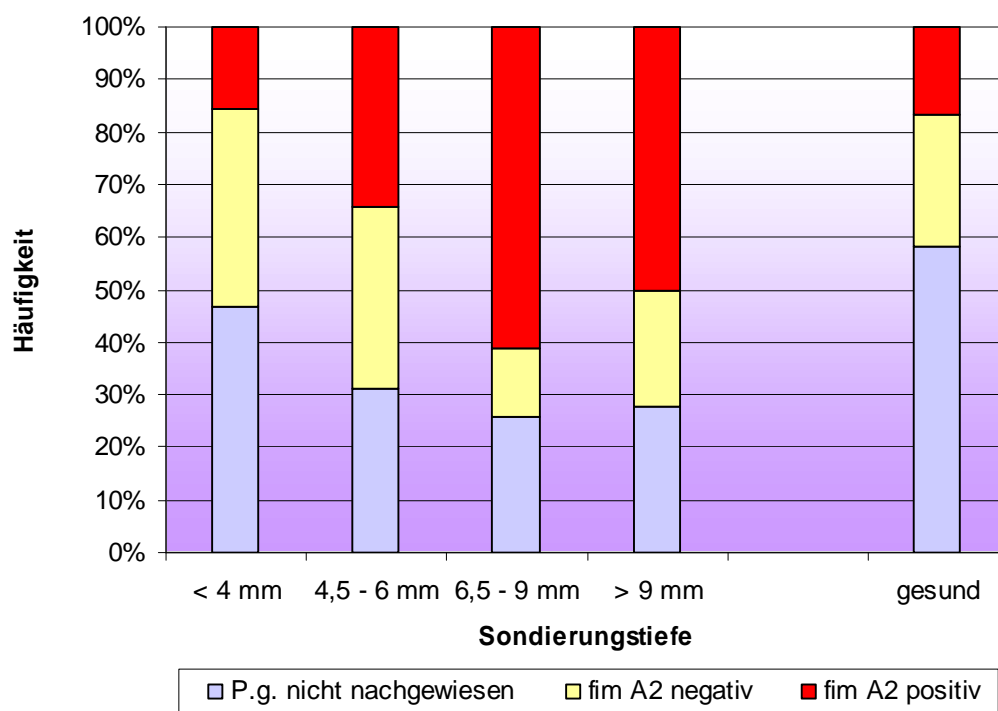


Abbildung 7

Häufigkeit des Nachweises von Fimbrilligen *fimA* Typ II in Abhängigkeit vom klinischen Parameter Sondierungstiefe

Prevotella intermedia

Bei dieser Spezies war die starke Besiedlung parodontal gesunder Personen mit über 80% positiven Proben, davon mehr als die Hälfte in der Klasse 10^4 , auffallend. Dagegen zeigten flache Taschen (< 4 mm) nur eine Belastung mit *P. intermedia* in ca. 47% der Proben, aber

der Gesamtanteil der Klasse 10^5 lag bereits bei ca. 19%. Mit steigender Sondierungstiefe nahm auch die Keimbelastung zu, so wiesen 11% der Proben mit einer Sondierungstiefen > 9 mm Zahlen von $\geq 10^7$ auf (Abb. 8, Tabelle 15 im Anhang).

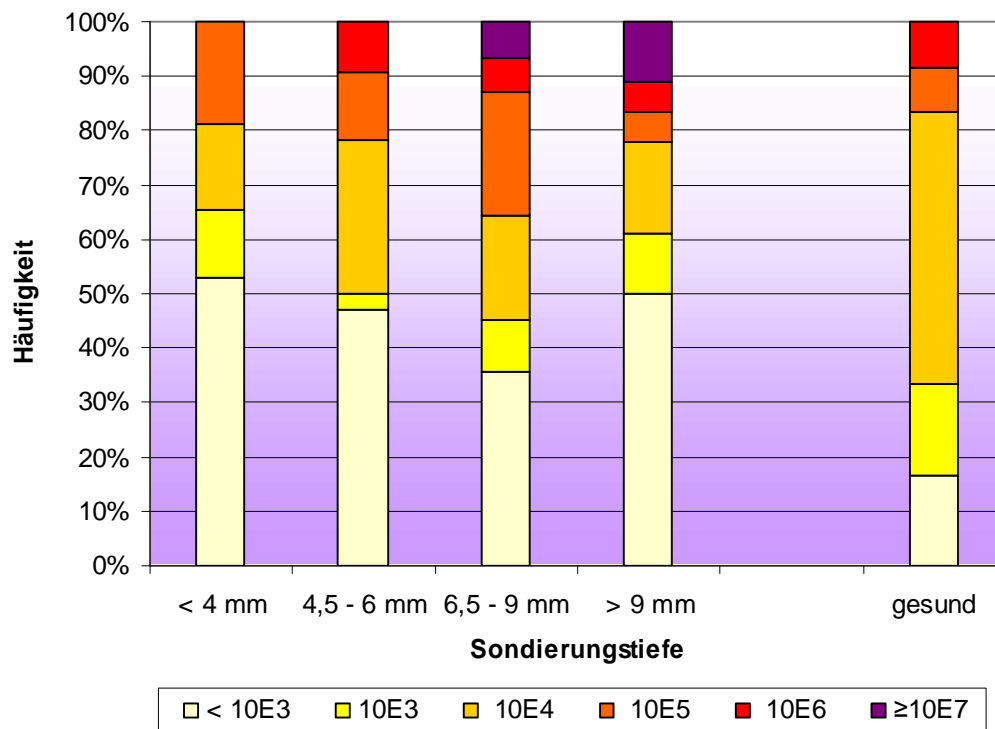


Abbildung 8
Quantitativer Nachweis von *P. intermedia* in Abhängigkeit vom klinischen Parameter Sondierungstiefe

Tannerella forsythia

Auch für *T. forsythia* konnte die Abhängigkeit der Keimbelastung von der Sondierungstiefe gesichert werden. Ein positiver Nachweis wurde bei den parodontal gesunden Personen zu 75% und bei den flachen Taschen (< 4 mm) zu 72% erbracht. Die Häufigkeit des Erregernachweises nahm mit der Sondierungstiefe weiter zu und erreichte bei sehr tiefen Taschen (> 9 mm) knapp 90% (Abb. 9, Tabelle 16 im Anhang). Hier lag der Anteil der Klasse $\geq 10^7$ bei fast 39%. Abgesehen von einem einzelnen Ergebnis bei den Gesunden von $\geq 10^7$ zeigte die Hälfte dieser Gruppe Keimzahlen knapp über der Nachweisgrenze von 10^3 .

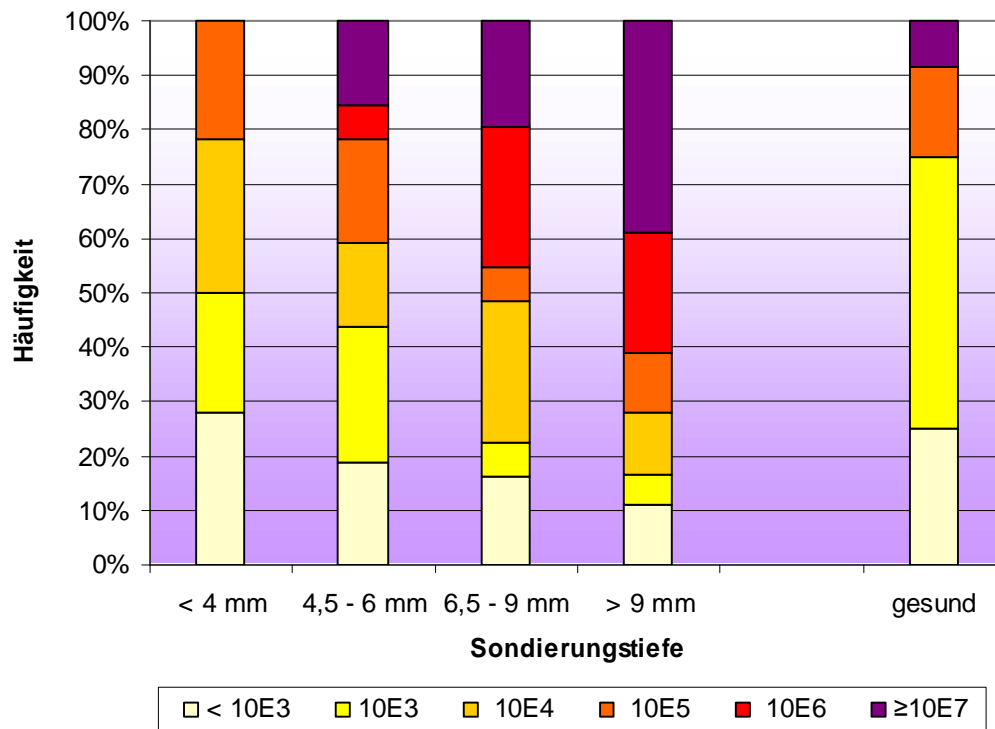


Abbildung 9
Quantitativer Nachweis von *T. forsythia* in Abhängigkeit vom klinischen Parameter Sondierungstiefe

Treponema species und Treponema denticola

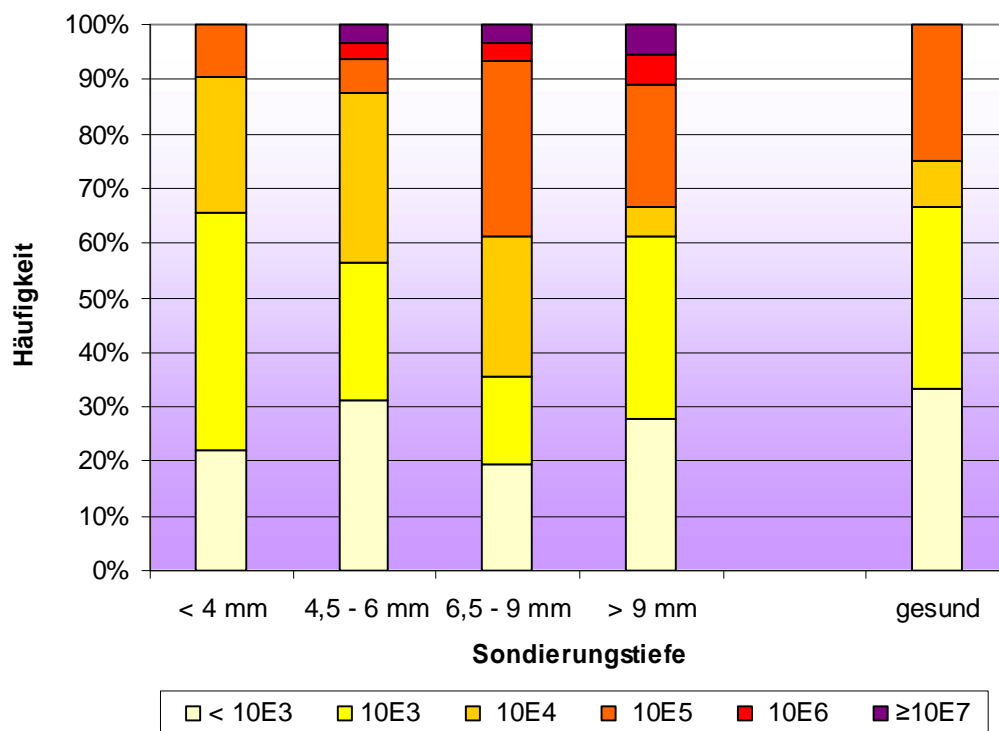


Abbildung 10
Quantitativer Nachweis von den *Treponema sp.* in Abhängigkeit vom klinischen Parameter Sondierungstiefe

Die Untersuchung der Belastung mit den *Treponema sp.* in Abhängigkeit von der Sondierungstiefe ergab bei den parodontal gesunden Personen bei zwei Dritteln der Proben einen positiven Nachweis, bei den erkrankten Parodontien schwankte der Anteil zwischen ca. 69% (4,5 – 6 mm) und ca. 80% (6,5 – 9 mm). Bei den Gesunden wies ein Viertel Keimzahlen von 10^5 auf. Der Anteil höherer Keimzahlen stieg bei den erkrankten Parodontien. Tiefe Taschen (6,5 – 9 mm) zeigten zu fast 40% Keimzahlen der Klassen 10^5 , 10^6 bzw. $\geq 10^7$ (Abb. 10, Tabelle 17 im Anhang).

Für *T. denticola* ergab sich bei den Gesunden ein positiver Nachweis in der Klasse 10^4 , bei den übrigen elf Proben konnte kein Nachweis erbracht werden. Dagegen wurde in 34% der Proben flacher Taschen (< 4 mm) dieser parodontopathogene Erreger identifiziert (Abb. 11, Tabelle 18 im Anhang). Ein Vergleich flacher Taschen (< 4 mm) mit tiefen Taschen ergibt für die Klasse 10^4 eine Zunahme Bakterienzahlen um 19%.

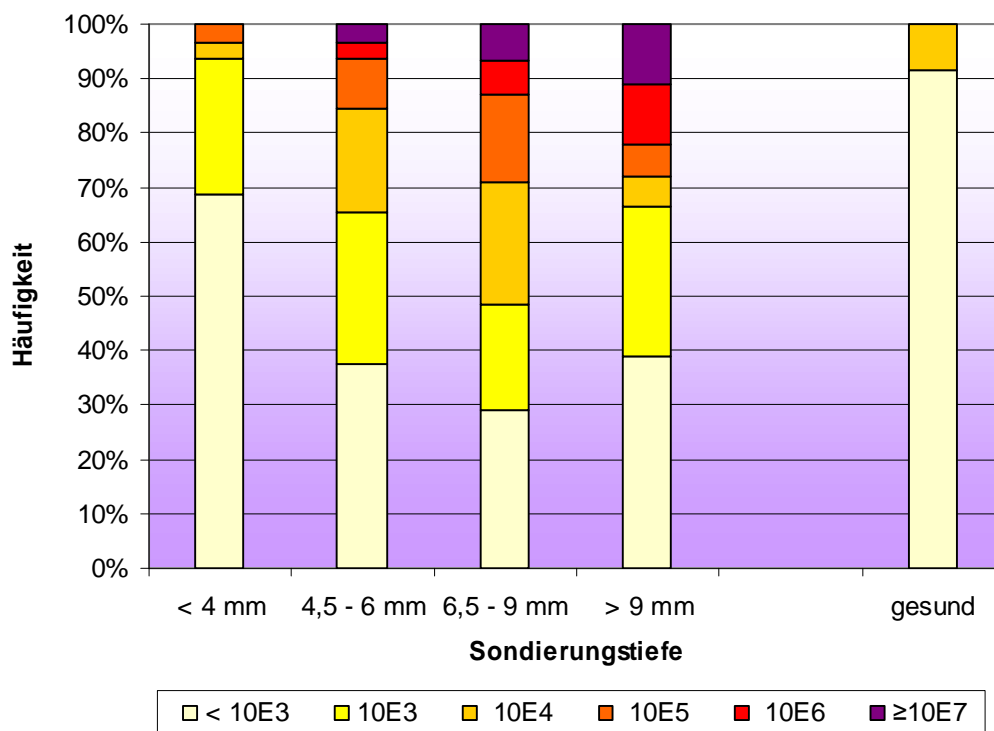


Abbildung 11
Quantitativer Nachweis von *T. denticola* in Abhängigkeit vom klinischen Parameter Sondierungstiefe

Streptococcus constellatus

Bei den parodontal gesunden Personen konnte für ein Drittel der Proben ein positiver Nachweis für *S. constellatus* erbracht werden, während der Erreger in flachen Parodontaltaschen bei ca. 43% der Proben nachweisbar war (Abb. 12, Tabelle 19 im Anhang). Keimzahlen 10^6 und $\geq 10^7$ traten insbesondere bei moderaten Taschen (4,5 – 6 mm) in 12% der Proben auf. Aber auch in den flachen Taschen erreichten knapp 22% der Proben die Klassen 10^4 und 10^5 .

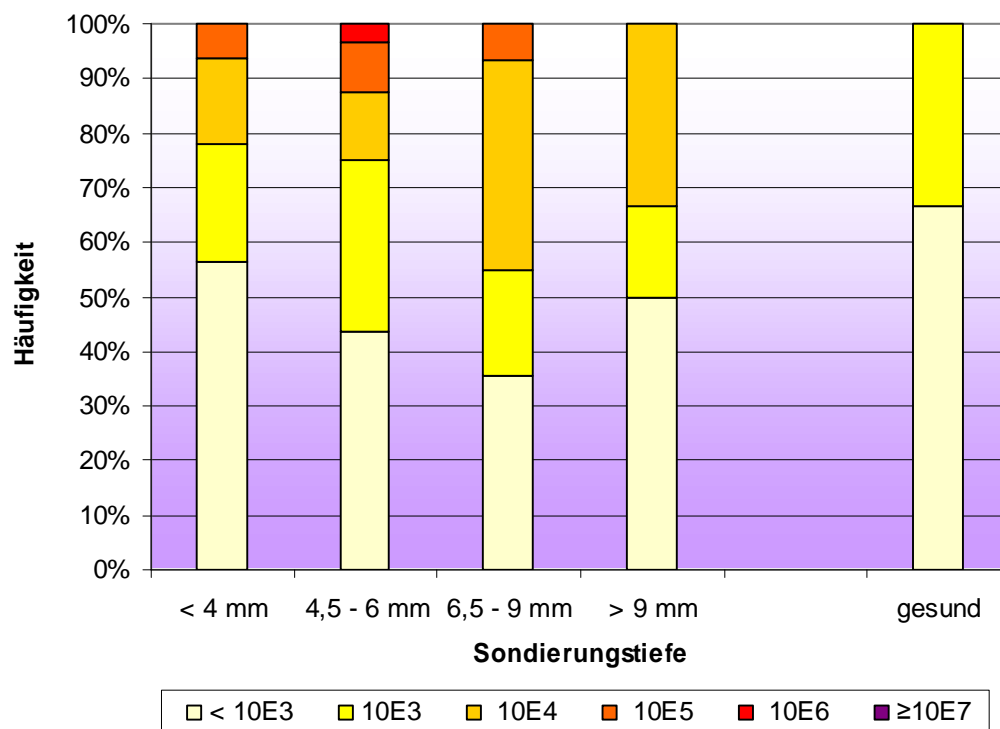


Abbildung 12
Quantitativer Nachweis von *S. constellatus* in Abhängigkeit vom klinischen Parameter Sondierungstiefe

Campylobacter rectus

Für diese Spezies ergab sich ein positiver Nachweis bei flachen Taschen (< 4 mm) in fast 60% der Proben. Moderate Taschen wiesen sogar 78% positive Proben für *C. rectus* auf. Auffällig war die Belastung parodontal gesunden Personen mit 75%. Eine Abhängigkeit von der Sondierungstiefe zeigte sich auch bei diesem parodontopathogenen Erreger in den sehr tiefen Taschen (> 9 mm) mit einem positiven Nachweis in 94% der Proben und 44% Keimzahlen von 10^5 (Abb. 13, Tabelle 20 im Anhang).

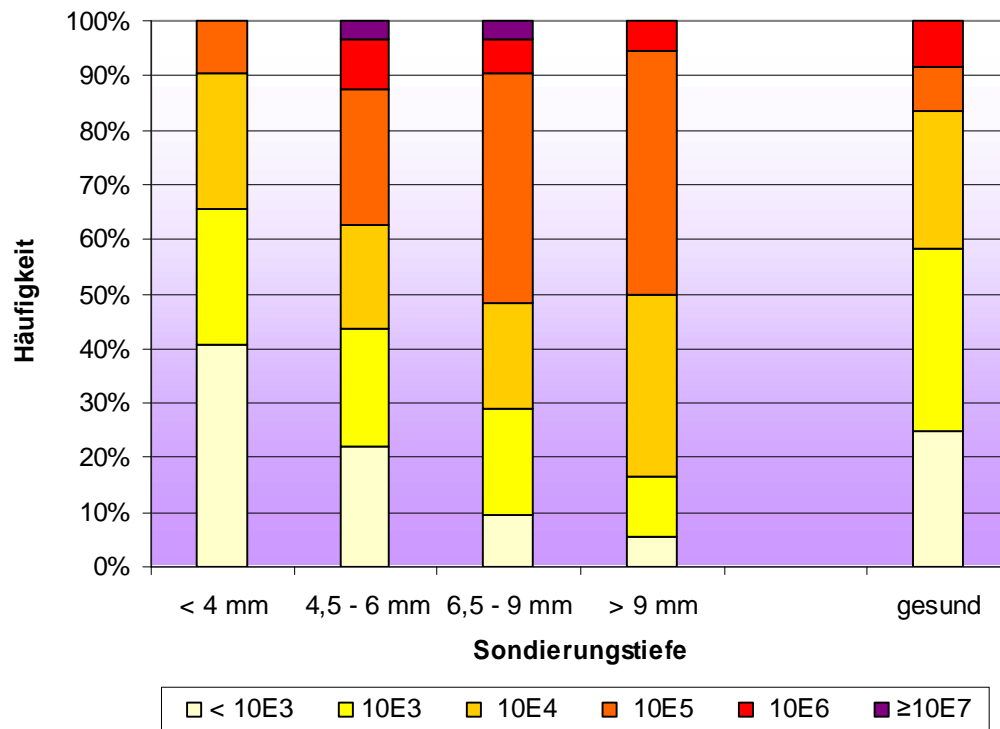


Abbildung 13
Quantitativer Nachweis von *C. rectus* in Abhängigkeit vom klinischen Parameter Sondierungstiefe

Fusobacterium nucleatum

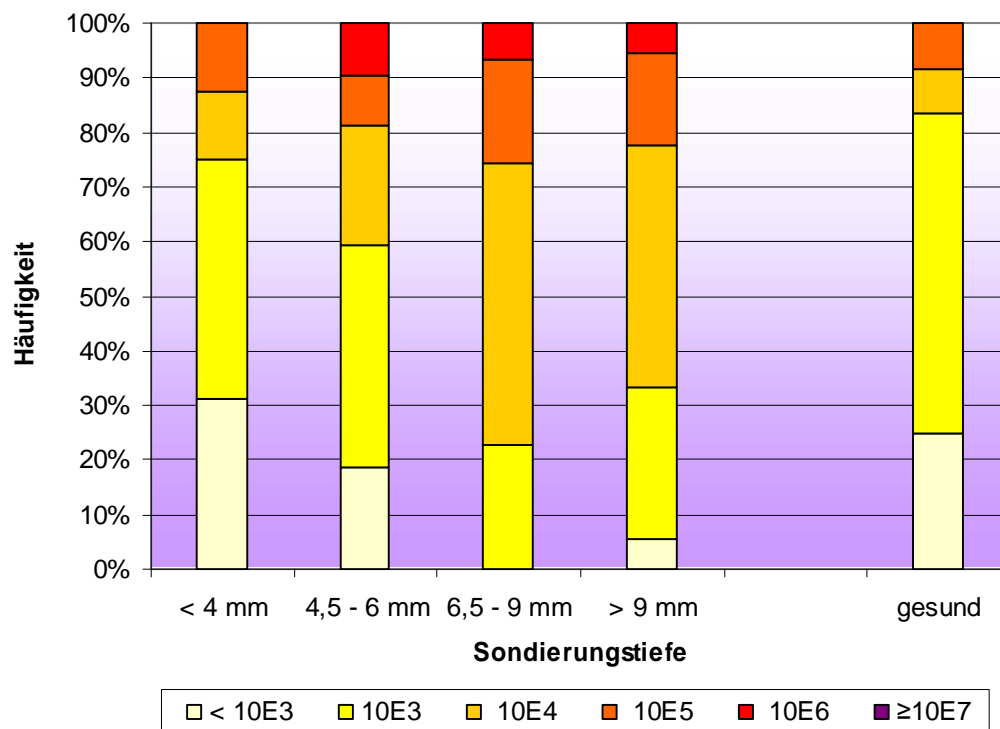


Abbildung 14
Quantitativer Nachweis von *F. nucleatum* in Abhängigkeit vom klinischen Parameter Sondierungstiefe

Im Vergleich flacher Parodontaltaschen (< 4 mm) mit der Keimbelastung parodontal gesunder Personen wurde *F. nucleatum* ähnlich häufig in 69% bzw. 75% der Proben nachgewiesen. Der Anteil der positiven Proben nahm bei den Parodontitispatienten mit der Sondierungstiefe zu und erreichte bei den tiefen Parodontaltaschen (6,5 – 9 mm) 100% (Abb. 14, Tabelle 21 im Anhang). Während in flachen Taschen 25% der Proben Keimzahlen $\geq 10^4$ *F. nucleatum* enthielten, betrug dieser Anteil in den Taschen ab einer Sondierungstiefe von 6,5 mm 68% – 78%.

Gesamtzahl der Bakterien

Die Abhängigkeit von der Sondierungstiefe konnte für die Gesamtzahl der Bakterien bestätigt werden. Flache Taschen (< 4 mm) und gesunde Personen besaßen in der Mehrheit der Proben nur Keimzahlen um 10^3 (Abb. 15, Tabelle 22 im Anhang). Die Belastung mit hohen Keimzahlen (10^6 , $\geq 10^7$) zeigte einen Zusammenhang zur Sondierungstiefe, sie stieg von 18% bei flachen Parodontaltaschen auf 28% bei moderaten Taschen (4,5 – 6 mm) sowie auf 29% bei tiefen Taschen (6,5 – 9 mm) und erreichte schließlich 33% bei sehr tiefen Taschen (> 9 mm).

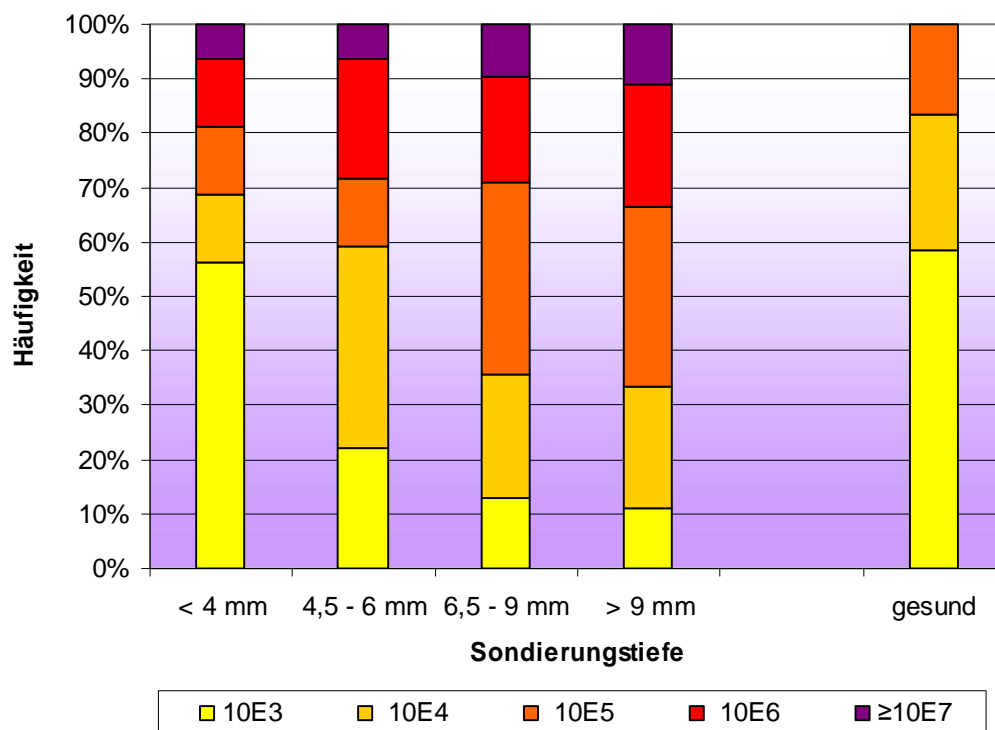


Abbildung 15
Quantitativer Nachweis von der Gesamtzahl der Bakterien in Abhängigkeit vom klinischen Parameter Sondierungstiefe

5.3 Korrelationsbetrachtungen zur nachgewiesenen Mikroflora

Die Korrelationsbetrachtungen dienten dem statistischen Nachweis von gemeinsam auftretenden Bakterienspezies sowie dem Zusammenhang zwischen Bakterienspezies, Virulenzfaktoren und ausgewählten klinischen Parametern. Die Gesamtzahl der Bakterien korrelierte mit *P. gingivalis*, *T. denticola*, *S. constellatus*, *C. rectus* und *F. nucleatum* (alle $p < 0,001$), sowie mit *P. intermedia*, *T. forsythia* und den *Treponema sp.* ($p < 0,01$). Die Spezies *A. actinomycetemcomitans* zeigte als Einzige keine Korrelation mit der Gesamtzahl der Bakterien.

A. actinomycetemcomitans trat häufig gemeinsam mit *T. forsythia* und *F. nucleatum* auf, es lag ein signifikanter Zusammenhang zu den beiden Spezies mit $p < 0,05$ vor. Leukotoxin-positive Stämme wurden vermehrt bei Patienten mit einer großen Anzahl von Taschen mit Sondierungstiefen > 5 mm und klinischem Attachmentverlust > 5 mm gefunden (jeweils $p < 0,05$).

P. gingivalis wurde oft zusammen mit *T. forsythia* ($p < 0,001$) und *T. denticola* ($p < 0,01$) detektiert. Diese Spezies korrelierte auch stark mit den *Treponema sp.* und *C. rectus* (beide $p < 0,001$) sowie mit *F. nucleatum* ($p < 0,01$). Stämme mit Fimbrillinen *fimA* Typ II wiesen einen positiven Zusammenhang mit *S. constellatus* auf ($p < 0,05$).

T. denticola und *Treponema sp.* traten gemeinsam auf ($p < 0,001$). Beobachtet werden konnten sehr starken Korrelationen von *F. nucleatum* mit *T. forsythia*, *T. denticola*, den *Treponema sp.*, *S. constellatus*, *C. rectus* und Fimbrillinen *fimA* Typ II (alle $p < 0,001$), sowie starke Korrelationen mit *P. gingivalis* ($p < 0,01$). *P. intermedia* wurde oft gemeinsam mit *F. nucleatum* ($p < 0,05$) und *T. denticola* ($p < 0,05$) in den Proben identifiziert, war aber noch ebenso sehr häufig zusammen mit *C. rectus* und den *Treponema sp.* vorhanden (beide $p < 0,001$).

Zum anderen konnte festgestellt werden, dass insbesondere BOP ($p < 0,001$), aber auch der API ($p < 0,05$) mit der Gesamtzahl der Bakterien in Zusammenhang standen. Mit zunehmenden BOP-Werten stieg die Zahl der Spezies *S. constellatus* und *P. intermedia* (beide $p < 0,05$). Hingegen war bei den *Treponema sp.* eine negative Korrelation gegenüber dem BOP ($p < 0,05$) vorhanden.

5.4 Statistischer Vergleich der Mikroflora von Parodontitispatienten vor Therapie mit Patienten nach nicht dauerhaft erfolgreicher Therapie

Bei den 113 Proben, die den Patienten mit einer Parodontitis entstammten, erfolgte ein Vergleich der subgingivalen Proben vor Therapiebeginn ($n = 68$, 19 Patienten) mit den subgingivalen Proben von nicht dauerhaft erfolgreich therapierten Parodontien ($n = 45$, 13 Patienten). Die Ergebnisse zur Gesamtkeimzahl, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* und *T. forsythia* werden in Abbildung 16 dargestellt (Tabelle 23 im Anhang), die Angaben zum Vorkommen von *Treponema sp.*, *T. denticola*, *S. constellatus*, *C. rectus* und *F. nucleatum* sind in der Abbildung 17 enthalten (Tabelle 24 im Anhang).

Die Gesamtzahl der Bakterien lag in allen 113 Proben unabhängig von ihrer Gruppenzugehörigkeit oberhalb der Nachweisgrenze von 10^3 . In der Gruppe 1 (Parodontitis vor Therapie) lag die Zahl der Proben in der Klasse 10^6 mit 22,1% deutlich über dem Ergebnis in der Gruppe 2 (Parodontitis ohne Therapieerfolg) mit 13,3%. Der Anteil der Plaqueproben mit Keimzahlen $\geq 10^7$ war in der Gruppe 1 mit 11,8% höher als in Gruppe 2 mit 2,2%.

Actinobacillus actinomycetemcomitans

Eine große Anzahl von Proben lag in beiden Gruppen unter der Nachweisgrenze. In Gruppe 1 wurde nur ein Drittel der Proben als positiv für *A. actinomycetemcomitans* ermittelt (33,8%), in Gruppe 2 war etwa ein Viertel der Proben positiv (24,4%).

Porphyromonas gingivalis

Diese beiden Gruppen unterschieden sich deutlich im Auftreten großer Bakterienmengen ($p < 0,05$). Während in Gruppe 1 auf die Klassen 10^5 und 10^6 zusammen 7,3% fielen, ergab sich bei Gruppe 2 für die gleichen Klassen ein Anteil von zusammen 24,4%. Ähnliche Werte zeigten sich bei den Gruppen 1 und 2 für $\geq 10^7$ mit 8,9% für Gruppe 2 und 5,9% für Gruppe 1. Häufiger gelang in Gruppe 1 der Nachweis von Keimzahlen 10^3 mit 32,4% gegenüber 20% in der Gruppe 2.

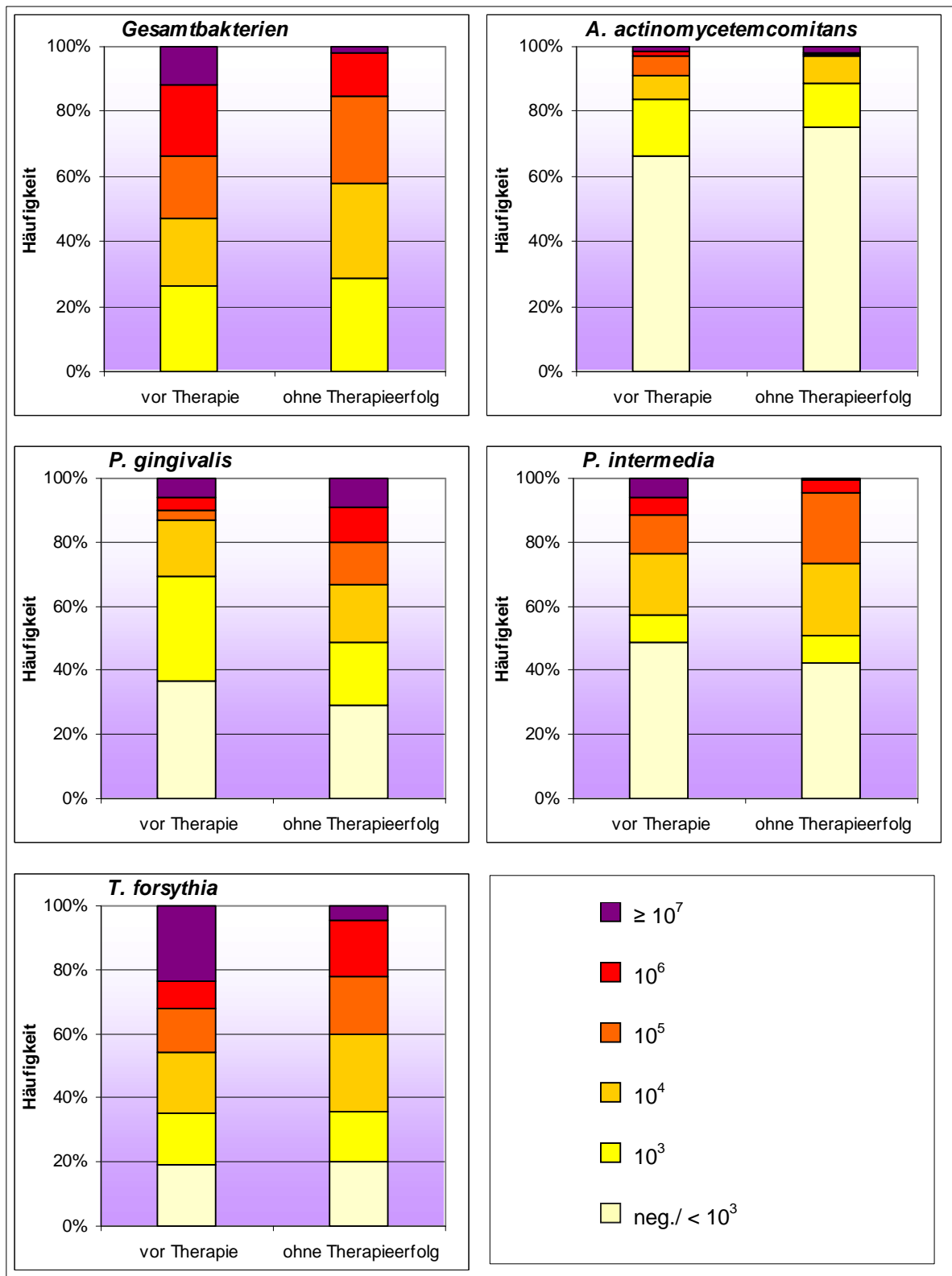


Abbildung 16

Darstellung des quantitativen Nachweises der Gesamtzahl der Bakterien, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* und *T. forsythia* mittels Real-time PCR bei unbehandelten Parodontitispatienten bzw. Parodontitispatienten mit nicht dauerhaft erfolgreicher Parodontalbehandlung.

Prevotella intermedia

Die Anteile der für diese Spezies positiven Proben waren mit 51,5% für Gruppe 1 und mit 57,8% für Gruppe 2 ähnlich. Deutliche Unterschiede traten in der Klasse 10^5 auf, mit 22,2% in Gruppe 2 gegenüber 11,8% in Gruppe 1. Weiterhin zeigte sich in Gruppe 1 bei 5,9% der Proben eine Belastung von $\geq 10^7$, während diese Klasse in der Gruppe 2 nicht erreicht wurde.

Tannerella forsythia

Bei den parodontal erkrankten Patienten wurde *T. forsythia* zu 80% in den Plaqueproben nachgewiesen (Gruppe 1: 80,9%, Gruppe 2: 80%). Insbesondere bei den Patienten vor dem Beginn der Parodontaltherapie gab es hohe Keimzahlen mit $\geq 10^7$ in 23,5% der Proben, während nur 4,4% der Proben in Gruppe 2 diese Menge hatten.

Treponema species und Treponema denticola

Spirochäten waren häufig in beiden untersuchten Gruppen vorhanden. In Gruppe 1 dominierte mit 35,3% vor allem die Klasse 10^3 und in Gruppe 2 die Klasse 10^4 mit 37,8%. Keimzahlen von $\geq 10^6$ waren in der Gruppe 1 in nur 7,3% der Proben und in der Gruppe 2 in 2,2% der Proben nachweisbar.

Deutliche Unterschiede konnten bei *T. denticola* festgestellt werden ($p < 0,05$). In der Gruppe 1 waren 64,7% der Proben positiv, in Gruppe 2 wurde diese Spezies jedoch nur in 44,4% der Proben von Gruppe 2 nachgewiesen. 7,4% der Proben von Gruppe 1 lagen im Bereich sehr hoher Keimzahlen ($\geq 10^7$), in der Gruppe 2 erreichte keine Probe diese Klasse. Hingegen zeigten sich bei den Gruppen 1 und 2 Ähnlichkeiten bei den Klassen 10^4 und 10^5 . Für 10^4 konnten Anteile von 13,3% in der Gruppe 2 und von 14,7% in der Gruppe 1 ermittelt werden. In der Klasse 10^5 beträgt der Anteil der Proben 8,8% bei Gruppe 1 und 8,9% bei Gruppe 2.

Streptococcus constellatus

Der Nachweis von *Streptococcus constellatus* gelang bei den Patienten vor Parodontitistherapie in 51,5% der Plaqueproben (Gruppe 1), und bei den Patienten mit nicht dauerhaft erfolgreicher Parodontaltherapie in 57,8% der Proben (Gruppe 2). Bei Gruppe 2 waren zusammen 53,3% der Proben den Klassen 10^3 und 10^4 zuzuordnen, während diese Klassen bei Gruppe 1 zusammen einen Anteil von 42,6% ausmachten. Keimzahlen von 10^5 wurden in Gruppe 1 bei 7,4% der Proben und von 10^6 bei 1,5% der Proben nachgewiesen.

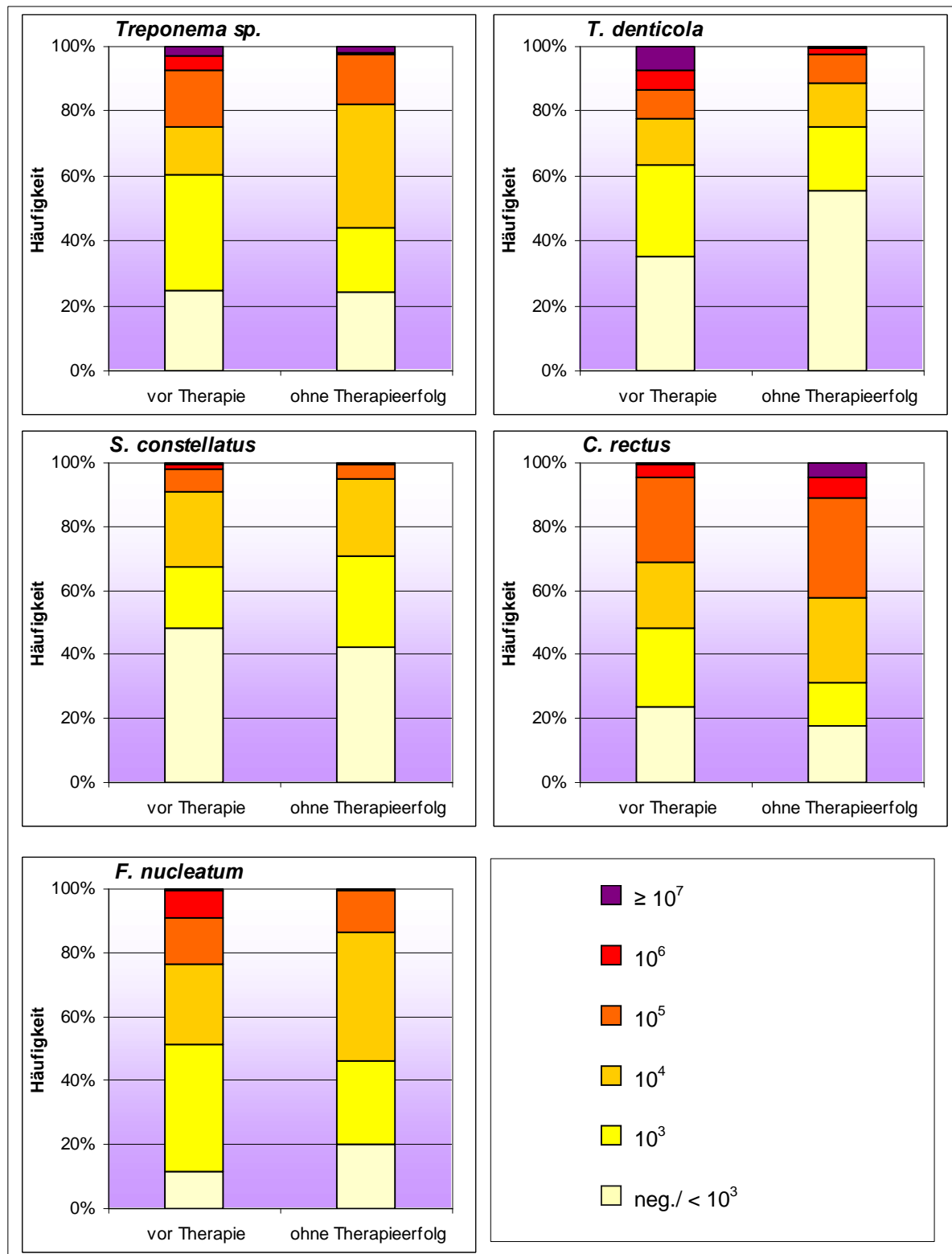


Abbildung 17

Darstellung des quantitativen Nachweises von *Treponema sp.*, *T. denticola*, *S. constellatus*, *C. rectus* und *F. nucleatum* mittels Real-time PCR bei unbehandelten Parodontitispatienten bzw. Parodontitispatienten mit nicht dauerhaft erfolgreicher Parodontalbehandlung.

Campylobacter rectus

Der Nachweis dieser Spezies ergab 76,5% positive Proben in Gruppe 1 und 82,2% positive Proben in Gruppe 2. In Gruppe 2 besaßen mit 57,8% über die Hälfte der Proben eine Belastung von Keimzahlen 10^4 bzw. 10^5 .

Fusobacterium nucleatum

88,2% der Plaqueproben von der Gruppe 1 sowie 80% der Proben von der Gruppe 2 waren positiv für *F. nucleatum*. Ein Viertel der Proben von Gruppe 1 zeigten Keimzahlen der Klasse 10^4 , hingegen waren 40% der Proben von Gruppe 2 dieser Keimzahlmenge zuzuordnen. Eine Belastung $\geq 10^6$ und wurde in der Gruppe 1 mit 8,8% erreicht.

6 Diskussion

6.1 Material und Methoden

Auf die Entwicklung eigener Primer wurde verzichtet und stattdessen eine Literaturrecherche durchgeführt. Allgemein sollen Primer eine Länge von 18 bis 30 Basen haben, wobei längere Primer die Spezifität der PCR-Reaktion erhöhten. Es musste darauf geachtet werden, dass die Basen Guanidin (G) und Cytosin (C) möglichst gleichmäßig im Primer verteilt waren und nicht im Bereich des 3'-Endes gehäuft auftraten, während der GC-Gehalt der Oligonukleotide optimal bei 40-60 % liegen sollte (Mülhardt 2002). Die Schmelztemperatur der Primer sollte zwischen 55°C und 80°C liegen, um ausreichend hohe Annealingtemperaturen, welche ca. fünf Grad Celsius unterhalb der Schmelztemperatur liegen mussten, zu erreichen (Mülhardt 2002). Die Primer durften nicht komplementär zueinander sein, um ihre Dimerisierung zu verhindern. Die Spezifität und Sensitivität der Primer für *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *C. rectus* und die Gesamtbakterien waren bestätigt (Ashimoto et al. 1996).

Im Rückblick erschienen die Primer für die Gesamtzahl der Bakterien nicht leistungsfähig genug, da diese Oligonukleotide möglicherweise zu unspezifisch für die 16S rRNA-Zielsequenz waren. Es wurde daher nicht ausreichend spezifisches 16S rRNA-Amplifikat der synthetisiert, infolge dessen die Quantifizierung ungenau blieb. Längere Amplifikate erhöhen die Wahrscheinlichkeit, dass die Taq-Polymerase fehlerhaft synthetisiert, daher sollten die Amplifikate eine Länge von 5000 Basen nicht überschreiten (Mülhardt 2002). Die verwendeten Primer ergaben in zahlreichen Fällen Amplifikate von einer Größe zwischen 257 und 641 Basen, nur die *Treponema sp.* wich die Amplifikatlänge mit 1497 Basen deutlich davon ab. Daher muss bei den PCR-Produkten der *Treponema sp.* mit einem größeren Quantifizierungsfehler als bei den anderen Spezies und Virulenzfaktoren gerechnet werden. Die verwendeten Primer für die Untersuchung der *Treponema sp.* sind deswegen als kritisch anzusehen, da die Taq-Polymerase bereits bei einem Amplifikat von 1000 Basenpaaren eine Fehlerquote von einem Prozent verursacht (Mülhardt 2002).

Im Zusammenhang mit der Etablierung der Real-time PCR wurde im Gegensatz zur microDent[®]-PCR keine Multiplex-PCR angestrebt. Auch gestattete der im Institut vorhandene PCR Thermocycler Rotor-Gene 2000 die Fluoreszenzmessung nur auf einem Kanal. Unabhängig von der Ausstattung des Thermocyclers kann ein simultanes Amplifizieren von

homologen Gensequenzen zu einem fehlerhaften Annealing der Primer oder auch der Produkte führen (Mülhardt 2002). Die Ausrichtung jedes Real-time PCR-Durchlaufes auf eine bestimmte Spezies bzw. einen Virulenzfaktor steigerte zwar der Arbeitsaufwand bei der Untersuchung der klinischen Proben, es konnte aber eine Dimerisierung zueinander komplementärer DNA-Abschnitte im Mastermix vermieden werden. Alle Primerpaare waren bereits erfolgreich in vorausgehenden PCR-Studien verwendet worden und wurden in dieser Studie mit einer konventionellen PCR vor ihrem Einsatz in der Real-time PCR geprüft.

Die DNA-Zielsequenz wurde in einem hoch-konservativen DNA-Abschnitt, wie es der 16S rRNA-Bereich darstellt, ausgesucht. Dieser weist zwischen den Bakterienspezies ausreichende Unterschiede auf, liegt aber innerhalb einer Spezies auch bei unterschiedlichen Stämmen identisch vor (Ashimoto et al. 1996).

Die Annealing-Temperatur sollte aufgrund der Größe, Basenzusammensetzung und Basenabfolge der Primer berechnet werden, ihre Optimierung kann aber auch empirisch stattfinden (Mülhardt 2002). Ashimoto et al. (1996) bezeichnen allgemein die Annealing-Temperatur als kritischen Parameter. Diese Autoren empfehlen für *T. forsythia*, *C. rectus*, *P. gingivalis* und *T. denticola* eine Annealingtemperatur von 60°C, die in diese Studie übernommen wurde. Weiterhin wurde für *A. actinomycetemcomitans* und *P. intermedia* die Annealing-Temperatur von 55°C eingehalten, wie von den Autoren angegeben. Sakamoto et al. (2001) verwendeten die Primer von Ashimoto et al., führten aber als Annealing-Temperatur für *T. forsythia* 62°C und für *T. denticola* 59°C ein, während die anderen Annealing-Temperaturen unverändert blieben.

Das Annealing der Primer für die *Treponema sp.* wurde bei 60°C, wie von Paster et al. (2001) angegeben, eingeleitet. Für *F. nucleatum* gaben Fouad et al. (2002) 60°C an, die in dieser Studie beibehalten wurden. Die Annealing-Werte für *S. constellatus* (Jacobs et al. 1996) lagen in der vorliegenden Studie bei 57°C und damit 2°C über den von den Autoren angegebenen Wert (55°C). Das Annealing der Primer vom Leukotoxingen (Goncharoff et al. 1993) fand in dieser Studie bei 55°C statt. Suzuki et al. (2001) führten das Annealing mit den gleichen Primer bei 54°C durch. Die Annealingtemperatur von 58°C der Primer für das Fimbrilligen Typ II wurde in der Real-time PCR angewandt, wie von Amano et al. (1999) für eine konventionelle PCR angegeben.

Ein Touch-Down der Annealing-Temperatur wurde nicht durchgeführt. Um die besonders zu Beginn der PCR bei bestimmten Primern wie *A. actinomycetemcomitans* vermuteten zahlreichen unspezifischen DNA-Amplifikate in ihrer Zahl zu limitieren, sollte ein Touch-Down von 5°C einprogrammiert werden.

In dieser Studie wurden bei der Real-time PCR 45 Zyklen einprogrammiert, wie auch bei Sakamoto et al. (2001) angegeben. Dagegen verwendeten Ashimoto et al. (1996) 36 Zyklen in der konventionellen PCR, um die PCR-Amplifikate der gleichen DNA-Sequenzen nachzuweisen.

Ashimoto et al. (1996) bezeichnen die MgCl_2 -Konzentration als kritischen Parameter. Die Autoren halten 1 mMol MgCl_2 -Endkonzentration als geeignet für den Nachweis von *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *C. rectus*, *P. gingivalis* und *T. denticola*. Die Mg^{2+} -Ionen beeinflussen das Annealing der Primer, die Trennung der DNA-Doppelstränge bei der Denaturierung, die Bildung von Primerdimeren und die Fehlerrate (Mülhardt 2002). Freies Mg^{2+} wird für die Polymeraseaktivität benötigt, die optimale Endkonzentration sollte zwischen 0,5 mM und 2,5 mM MgCl_2 liegen (Mülhardt 2002). In der hier vorliegenden Studie lag die Endkonzentration bei 2,5 mMol. Dagegen nutzten Sakamoto et al. (2001) für *A. actinomycetemcomitans* eine 3 mMol MgCl_2 -Konzentration, für *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* eine 4 mMol MgCl_2 -Konzentration.

Fehlerquellen können auch bei dem DNA-Fluoreszenzfarbstoffes SYBR®Green I vermutet werden. Allgemein bindet SYBR®Green I an jede vorhandene Doppelstrang-DNA. Damit würden theoretisch unerwünschte unspezifische DNA-Amplifikate nach Dimerisierung in der Lage sein, die quantitativen Messergebnisse des Rotor-Gene 2000 zu verändern (Corbett 2000). Im Vorfeld der Real-time PCR mit Untersuchung der DNA enthaltenden klinischen Proben wurden daher die Bakterien-Referenzstämme eingesetzt, um die Wahrscheinlichkeit einer fehlerhaften DNA-Synthese zu minimieren. Nach Einsetzen der Primer in der konventionellen PCR entsprachen die Banden in der Agarose-Gelelektrophorese den jeweils zu erwartenden Amplifikaten.

Die microDent®-PCR stellt ein semiquantitatives Messverfahren dar, welches auf visueller Beurteilung der Bandenstärke auf den Nitrozellulosestreifen nach reverser DNA-Hybridisierung basiert. Dabei werden alle in der PCR-Plateauphase vorhandenen spezifischen

DNA-Amplifikate erfasst. Die im Rotor-Gene 2000 durchgeführte Real-time PCR erlaubte die Quantifizierung in Echtzeit, insbesondere in der aussagestärkeren exponentiellen Phase. Die Standardkurve gestattet genaue Rückschlüsse auf die DNA-Ausgangsmengen in den Proben.

Hinsichtlich der Quantifizierung spielt der Zeitpunkt der Fluoreszenzmessung eine große Rolle. Da in der konventionellen PCR die Plateauphase durch die Ermüdung der Enzyme und den Mangel an Substrat eingeleitet wird, birgt eine Messung in dieser Phase Unsicherheiten. Durch Messung in der exponentiellen Phase besitzt die Real-time PCR gegenüber der konventionellen PCR somit einen entscheidenden Vorteil (Kainz 2000). In dieser Studie wurde ab 1000 DNA-Molekülen ein positiver Nachweis definiert. Obwohl theoretisch ein einziges DNA-Molekül mit den PCR-Verfahren nachgewiesen werden könnte, sind in der Praxis zum Amplifizieren wenigstens 100 bis 1000 DNA-Moleküle erforderlich, 10^5 DNA-Templates eignen sich zum problemlosen Amplifizieren (Mülhardt 2002). Smola et al. (2003) erwarten bei einer Nachweisschwelle von 10^3 bis 10^4 Bakterien pro Probe von der PCR-Diagnostik allein keine klinische Entscheidungsfindung, sehen aber in ihr eine Unterstützung der Parodontitisprophylaxe und Parodontitistherapie von Patienten mit einem kardiovaskulären Risiko oder Patienten mit einem Diabetes mellitus.

Der C_T -Wert wird definiert als die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal bereits deutlich vom Hintergrund abhebt, die Real-time PCR sich aber noch in der exponentiellen Phase befindet (Mülhardt 2002). Die Beurteilung der Ausgangsmenge an spezifischer DNA wurde durch die Verdünnungsreihe mit bekannten Templatemenen erleichtert, aus der erstellten Standardkurve konnte dann auch aus einem C_T -Wert auf die Templatemenge geschlossen werden.

6.2 Vergleich der Real-time PCR mit konventioneller PCR (microDent®) und mit Kulturverfahren

Hauptziel dieser Studie war die Etablierung der Real-time PCR zur vergleichenden Analyse der Mikroflora von 125 klinischen Plaqueproben. Es wurde ein Vergleich zwischen Real-time PCR und microDent®-PCR sowie zwischen Real-time PCR und Kulturverfahren durchgeführt. Die Etablierung der Real-time PCR für den Nachweis parodontopathogener Bakterienspezies gelang. Die Analyse aller Plaqueproben in Bezug auf acht ausgewählte Bakterienspezies, den *Treponema sp.* und der Gesamtzahl der Bakterien sowie den Virulenzfaktoren wurde mit der Real-time PCR erfolgreich durchgeführt.

Die Ergebnisse von microDent®-PCR und Real-time PCR zeigten für *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* gute bis sehr gute Übereinstimmungen. Es konnte für die Spezies *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* eine statistisch signifikante Korrelation beider Verfahren ermittelt werden. Hingegen wurde für *P. intermedia* keine signifikante Übereinstimmung der Ergebnisse beider Verfahren ermittelt. In der Real-time PCR konnte *P. intermedia* deutlich häufiger und in größeren Keimzahlen nachgewiesen werden als in der konventionellen PCR (microDent®). Als Ursache für die abweichenden Ergebnisse der Real-time PCR und der microDent®-PCR kommen die in beiden Verfahren verwendeten unterschiedlichen Primer in Betracht.

Eine arbitrarily primed PCR (AP-PCR) würde durch das Benutzen von Zufallssequenzen in den Primern Vorteile bei einer Subtypisierung von unbekannten Stämmen einer Bakterienspezies bringen, wie Suzuki et al. (2001) am Beispiel von *A. actinomycetemcomitans* zeigten. Diese Technik wäre auch bei den anderen Spezies anwendbar, beinhaltet aber umfangreiche Maßnahmen bei der Synthese und Anwendung dieser spezifisch auf die Subtypen der Bakterienspezies ausgerichteten Primer. Kürzlich verwendeten Alves et al. (2006) eine AP-PCR für Genotypen von *P. intermedia* und wiesen eine größere Anzahl von Genotypen mit steigender Sondierungstiefe nach. Da die subgingivalen Proben dieser Studie aus unterschiedlichen Sondierungstiefen stammten, können durch unterschiedliche Genauigkeiten der Primer bei der Erfassung der Genotypen Abweichungen auftreten. Für eine gezielte mikrobiologische Diagnostik erscheint dieses Verfahren ungeeignet.

Yoshida et al. (2005) gelang mit einer Multiplex-PCR der gleichzeitige Nachweis von *P. intermedia* und *P. nigrescens* in der subgingivalen Plaque und im Zungenbelag, hingegen konnten beide Spezies im Speichel nicht identifiziert werden. Diese Autoren stellen aber fest, dass die Rolle der schwarz pigmentierten Prevotella-Spezies bei der Parodontitis weiterhin unklar bleibt.

Bei dem Vergleich der Ergebnisse von Real-time PCR und Kulturverfahren ist die in der Real-time PCR große Anzahl der positiven Proben für die Erreger *S. constellatus* und *C. rectus*, die aber in den Kulturverfahren negative Ergebnisse erbrachten, auffällig. Eine Erklärung könnte darin bestehen, dass für diese beiden Erreger in der Kultur keine Selektivmedien zu Anwendung kamen.

Hingegen erbrachten die Selektivmedien bei *F. nucleatum* bessere Übereinstimmungen der Real-time PCR mit den Kulturverfahren. Die Zahl der in der Real-time PCR positiven und gleichzeitig in der Kultur negativen Proben war deutlich niedriger als bei *S. constellatus* und *C. rectus*. Auch für *A. actinomycetemcomitans* wurde der Vorteil der Verwendung von Selektivmedien durch gute Übereinstimmungen bei dem Vergleich von Kulturverfahren und der microDent[®]-PCR bestätigt (Eick und Pfister 2002).

Die Abhängigkeit der Kulturverfahren von vitalen Bakterienzellen stellt trotz vorhandener geeigneter Transportmedien einen kritischen Aspekt für den Vergleich der Ergebnisse mit den nur auf DNA-Äquivalente angewiesenen PCR-Verfahren dar. Die dieser Studie vorliegenden Plaqueproben waren mit sterilen Papierspitzen gewonnenen und im Transportmedium VMGA III (Dahlen et al. 1993) an das Institut für Medizinische Mikrobiologie der FSU gesandt worden. Dort wurden die Kultivierungsmaßnahmen sofort eingeleitet und der verbliebene Probenanteil der DNA-Extraktion zugeführt.

Nachteil aller PCR-Verfahren ist die nur auf bekannte Gensequenzen ausgerichtete Suche, die eventuell vorliegende Mutationen DNA-Sequenzen nicht erfasst. Hier erweisen sich die Kulturverfahren als vorteilhaft, da das Probenmaterial angezüchtet wird, ohne auf bestimmte DNA-Sequenzen der Bakterienspezies angewiesen zu sein (van Winkelhoff 2003).

Bei den vier Vergleichsuntersuchungen der Real-time PCR mit den Kulturverfahren konnte nur für die Gesamtzahl der Bakterien eine signifikante Korrelation ermittelt werden, während für die Bakterienspezies *S. constellatus*, *C. rectus* und *F. nucleatum* keine Korrelation der Verfahren vorlag. Jervøe-Storm et al. (2005) verglichen eine kommerziell erhältliche Real-time PCR mit Kulturverfahren und fanden geringgradige Übereinstimmungen bei *F. nucleatum* und *P. intermedia*, gute Übereinstimmungen bei *T. forsythia* und sehr gute Ergebnisse für den Vergleich bei *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis*. Als mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse der Verfahren geben die Autoren die in der Kultur fehlende Unterscheidung zwischen *P. intermedia* und *P. nigrescens* und eingeschränkte Möglichkeiten zur Differenzierung eng untereinander verwandter *Fusobacteria* an.

Die Einbeziehung des klinischen Parameters Sondierungstiefe sollte einen Bezug zwischen dem klinischen Bild und den mikrobiologischen Ergebnissen herstellen. Insbesondere bei den Spezies *P. gingivalis*, *T. forsythia*, den *Treponema sp.* einschließlich *T. denticola*, *C. rectus* sowie *F. nucleatum* war eine Abhängigkeit von der Sondierungstiefe feststellbar. Die Ergebnisse zeigten aber auch, dass einige Spezies – wie *P. gingivalis* – bei parodontal gesunden Personen nachweisbar waren, jedoch in deutlich niedrigeren Keimzahlen. Der Virulenzfaktor Fimbrillinen *fimA* Typ II zeigte ebenfalls eine Assoziation zur Sondierungstiefe, auch korrelierte dieser Virulenzfaktor deutlich mit *C. rectus*, *F. nucleatum* und mit den *Treponema sp.* Eine Korrelation mit *T. forsythia* oder *T. denticola* aus dem „roten Komplex“ (Sokransky et al. 1998), wie sie für *P. gingivalis* in dieser Studie nachgewiesen werden konnte, war aber für den Virulenzfaktor allein nicht festzustellen. Daher sollte der Speziesnachweis von *P. gingivalis* weiterhin Vorrang vor der Bestimmung des Fimbrillinen Typ II haben. Auch Doungudomdacha et al. (2001) wiesen *P. gingivalis* mit einer quantitativen PCR in Abhängigkeit von der Sondierungstiefe nach, jedoch stand der Erregernachweis zusätzlich in Zusammenhang mit dem klinischen Attachmentverlust.

Bei dem Virulenzfaktor Leukotoxingen als auch bei *A. actinomycetemcomitans* selbst war die Abhängigkeit von einer steigenden Sondierungstiefe nicht erkennbar. Sondierungstiefen > 5 mm und ein klinischer Attachmentverlust erbrachten jedoch einen signifikant häufigeren positiven Nachweis des Leukotoxingens. Allgemein lag keine signifikante Korrelation des Leukotoxingens mit dem Erreger *A. actinomycetemcomitans* vor. Bei den subgingivalen Plaqueproben handelte es sich jedoch um Patienten mit einer chronischen Parodontitis,

dagegen wurden Leukotoxin-positive Proben überwiegend bei Patienten mit einer aggressiven Parodontitis gefunden (Mombelli et al. 2002). Andererseits wird damit die von Socransky und Haffajee (2005) beschriebene Sonderstellung von *A. actinomycetemcomitans* unterstrichen. Bei der lokalisierten aggressiven Parodontitis, welche häufiger bei Jugendlichen anzutreffen ist, spielt *A. actinomycetemcomitans* mit seinen Virulenzfaktoren, wie dem Leukotoxin, eine bedeutende Rolle (Diaz et al. 2006).

Innerhalb der Korrelationsbetrachtungen kann die statistisch gesicherte, enge Assoziation von *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* als klinisch relevant bezeichnet werden, die schon Socransky et al. (1998) unter der Bezeichnung „roter Komplex“ beschrieben.

Auch Ashimoto et al. (1996) führten eine Betrachtung der Assoziation bestimmter Bakterienspezies durch. Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Studie waren die enge Assoziation der Vertreter des „roten Komplexes“, sowie von *A. actinomycetemcomitans* und *T. forsythia*. Hingegen fanden diese Autoren mit den gleichen Primern auch Assoziationen von *A. actinomycetemcomitans* mit *P. gingivalis* und *T. denticola*, die in der hier vorliegenden Studie nicht bestätigt werden konnten.

Im Vergleich der Mikroflora von Parodontitispatienten vor geplanter Therapie mit den Patienten nach nicht dauerhaft erfolgreicher Parodontistherapie war die Gesamtzahl der Bakterien in der Gruppe der Parodontitispatienten deutlich gegenüber der Gruppe der behandelten Parodontitispatienten erhöht. Es lagen in der Zusammensetzung der subgingivalen Plaque zwischen beiden Gruppen auch bei anderen Spezies quantitative Unterschiede vor.

P. gingivalis wurde bei den nicht erfolgreich therapierten Patienten häufiger und in großen Mengen gefunden, genau wie *P. intermedia*, *S. constellatus* und *C. rectus*. Hingegen traten *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *T. denticola* und *F. nucleatum* etwas häufiger und in größeren Mengen bei den Parodontitispatienten vor Therapiebeginn auf. Die Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen sind bei *T. forsythia* aber nicht stark, sodass bei den bereits behandelten Parodontitispatienten die parodontopathogene Potenz dieses Erregers im „roten Komplex“ zusammen mit den ebenfalls häufig nachweisbaren Erregern *P. gingivalis* und *T. denticola* ein Grund für die nicht erfolgreiche Parodontistherapie sein könnte.

7 Schlussfolgerungen

Zur Analyse der Mikroflora parodontaler Taschen steht mit der Real-time PCR eine leistungsstarke molekularbiologische Methode zur Verfügung, die auf bekannte Gene parodontopathogener Bakterien einschließlich ihrer Virulenzfaktoren ausgerichtet ist. Aussagen über die Progression von Parodontitiden sind möglich, wenn die wesentlichen Erreger quantifiziert werden. Die Betrachtung klinischer Parameter sollte in jedem Fall hinzugezogen werden.

Bei der Real-time PCR handelt es sich um eine kostengünstige molekularbiologische Methode, die vordergründig auf die Bedürfnisse wissenschaftlicher Studien, wie epidemiologischen Untersuchungen, ausgerichtet ist. Der entscheidende Vorteil besteht in der Möglichkeit des Verfahrens, große Probenmengen in kurzer Zeit und mit relativ geringem Arbeits- und Materialaufwand zu untersuchen. Dagegen sind mit dem hier etablierten Verfahren Untersuchungen von Einzelproben kostspielig, da für jede Bakterienspezies ein neuer PCR-Ansatz erforderlich ist. Hier sind die erhältlichen kommerziellen PCR-Verfahren, die als Multiplex-PCR mehrere Bakterienspezies gleichzeitig nachweisen können, überlegen. Deutliche Vorteile der Real-time PCR gegenüber den Kulturverfahren beruhen auf der zeitlich unabhängigen und reproduzierbaren quantitativen Untersuchung nicht zwingend vitaler Plaqueproben. Dagegen können mit den Kulturverfahren die Resistenzbestimmungen im Vorfeld einer adjuvanten Antibiose bei einer Parodontaltherapie sehr effizient durchgeführt werden.

Die Diagnostik der parodontalen Mikroflora sollte *A. actinomycetemcomitans* einschließen, hier erscheint eine Beschränkung auf die Leukotoxigen-positiven Stämme sinnvoll. Weiterhin sollten in der Analyse *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* berücksichtigt werden. In einer umfangreicheren Diagnostik sind daneben *S. constellatus*, *P. intermedia*, *C. rectus* und *F. nucleatum* zu erfassen.

Literaturverzeichnis

AAP (Adams DA, Barrington EP, Caton J, Genco RJ, Goodman SF, Hildebrand CN, Jeffcoat MK, Karsh F, King SB, Mealey BL, Meffert RM, Mellonig JT, Nevins M, Offenbacher S, Reiser GM, Rose LF, Rosen PR, Townsend CL, Zackin SJ). 2000. Parameter on chronic periodontitis with slight to moderate loss of periodontal support. J Periodontol, 71:853–855. Supplement.

Ainamo J, Bay I. 1975. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. Int Dent J, 25:229–235.

Akifusa S, Poole S, Lewthwaite J, Henderson B, Nair SP. 2001. Recombinant *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin proteins are required to interact to inhibit human cell cycle progression and to stimulate human leukocyte cytokine synthesis. Infect Immun, 69:5925–5930.

Albandar JM. 2005. Epidemiology and risk factors of periodontal diseases. Dent Clin North Am, 49:517–532.

Alves AC, Napimoga MH, Klein MI, Hofling JF, Goncalves RB. 2006. Increase in probing depth is correlated with a higher number of *Prevotella intermedia* genotypes. J Periodontol, 77:61–66.

Amano A, Sojar HT, Lee JY, Sharma A, Levine MJ, Genco RJ. 1994. Salivary receptors for recombinant fimbriin of *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun, 62:3372–3380.

Amano A, Kuboniwa M, Kataoka K, Tazaki K, Inoshita E, Nagata H, Tamagawa H, Shizukuishi S. 1995. Binding of hemoglobin by *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Microbiol Lett, 134:63–67.

Amano A, Nakagawa I, Kataoka K, Morisaki I, Hamada S. 1999. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with *fimA* genotypes in Periodontitis patients. J Clin Microbiol, 37:1426–1430.

- Amano A. 2003. Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: Implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol*, 74:90–96.
- Armitage GC. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 4:1–6.
- Asai Y, Jinno T, Igarashi H, Ohyama Y, Ogawa T. 2002. Detection and quantification of oral treponemes in subgingival plaque by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 29:3334–3340.
- Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. 1996. Polymerase chain reaction of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol*, 11:266–273.
- Bakken V, Aaro S, Hofstad T, Vasstrand EN. 1989. Outer membrane proteins as major antigens of *Fusobacterium nucleatum*. *FEMS Microbiol Immunol*, 1:473–483.
- Beikler T, Flemming TF, Karch H. 2005. Mikrobiologische Diagnostik in der Parodontitistherapie. *Dtsch Zahnärztl Z*, 60:660–662.
- Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. 1996. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev*, 9:55–71.
- Borrell LN, Burt BA, Warren RC, Neighbors HW. 2006. The role of individual and neighborhood social factors on periodontitis: The third national health and nutrition examination survey. *J Periodontol*, 77:444–453.
- Caldwell DE, Atuku E, Wilkie DC, Wivcharuk KP, Karthikeyan S, Korber DR, Schmid DF, Wolfaardt GM. 1997. Germ theory vs. community theory in understanding and controlling the proliferation of biofilms. *Adv Dent Res*, 11:4–13.
- Chen T, Nakayama K, Belliveau L, Duncan MJ. 2001. *Porphyromonas gingivalis* gingipains and adhesion to epithelial cells. *Infect Immun*, 69:3048–3056.

Colombo AP, Sakellari D, Haffajee AD, Tanner A, Cugini MA, Socransky SS. 1998. Serum antibodies reacting with subgingival species in refractory periodontitis subjects. *J Clin Periodontol*, 25:596–604.

Corbett. 2000. Rotor-Gene 2000 Real Time Amplification Operator's Manual. Corbett Research, 1/14 Hilly St, Mortlake 2137 N.S.W. Australia.

Dahlen G, Pipattanogovit P, Rosling B, Möller AJR. 1993. A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol*, 8:375–382.

D'Aiuto F, Parkar M, Brett PM, Ready D, Tonetti MS. 2004. Gene polymorphisms in pro-inflammatory cytokines are associated with systemic inflammation in patients with severe periodontal infections. *Cytokine*, 28:29–34.

Demuth DR, Irvine DC, Costerton JW, Cook GS, Lamont RJ. 2001. Discrete protein determinant directs the species-specific adherence of *Porphyromonas gingivalis* to oral streptococci. *Infect Immun*, 69:5736–5741.

Diaz R, Ghofaily LA, Patel J, Balashova NV, Freitas AC, Labib I, Kachlany SC. 2006. Characterization of leukotoxin from a clinical strain of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microb Pathog*, 40:48–55.

Dolic M, Bailer J, Staehle HJ, Eickholz P. 2005. Psychosocial factors as risk indicators of periodontitis. *J Clin Periodontol*, 32:1134–1140.

Dorn BR, Leung KP, Progulske-Fox A. 1998. Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. *Infect Immun*, 66:6054–6057.

Dorn BR, Dunn Jr. WA, Progulske-Fox A. 1999. Invasion of human coronary artery cells by periodontal pathogens. *Infect Immun*, 67:5792–5798.

Doungudomdacha S, Rawlinson A, Welsh TF, Douglas CWI. 2001. Effect of non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and the numbers of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* at adult periodontitis sites. J Clin Periodontol, 28:437–445.

Eick S, Pfister W. 2002. Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. J Clin Periodontol, 29:638–644.

Eick S, Rödel J, Einax JW, Pfister W. 2002. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with KB cells: comparison of different clinical isolates. Oral Microbiol Immunol, 17:201–208.

Fouad AF, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R, Hazlett K, Radolf JD. 2002. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. J Clin Microbiol, 40:3223–3231.

Freyer RP. 2003. Einfluss des Interleukin 1-Genotyps auf den Therapieerfolg bei Patienten mit einer chronischen Parodontitis [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

Genco RJ, Zambon JJ, Murray PA. 1985. Serum and gingival fluid antibodies as adjuncts in the diagnosis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontal disease. J Periodontol, 56:41–50.

Goncharoff P, Figurski DH, Stevens RH, Fine DH. 1993. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: polymerase chain reaction amplification of *lktA*-specific sequences. Oral Microbiol Immunol, 8:105–110.

Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, Norderyd OM, Genco RJ. 1994. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. J Periodontol, 65:260–267.

Hafstrom C, Dahlen G. 1997. Pathogenicity of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates in a wound chamber model in rabbits. Oral Microbiol Immunol, 12:148–154.

Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Benzarti N, Baelum V. 2004. The highly leukotoxic JP2 clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and progression of periodontal attachment loss. J Dent Res, 83:767–770.

Heitz-Mayfield LJ. 2005. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. J Clin Periodontol, 32:196–209.

Henderson B, Nair SP, Ward JM, Wilson M. 2003. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Annu Rev Microbiol, 57:29–55.

Hilgert JB, Hugo FN, Bandeira DR, Bozzetti MC. 2006. Stress, cortisol, and periodontitis in a population aged 50 years and over. J Dent Res, 85:324–328.

Hoffmann T. 2005. Parodontalerkrankungen - Grundlagen und Diagnostik - Epidemiologie. In: Gängler P, Hoffmann T, Willershausen B, Schwenzer N, Ehrenfeld M, Hrsg. Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie, Zweite Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, S. 251.

Ishihara K, Nabuchi A, Ito R, Miyachi K, Kuramitsu HK, Okuda K. 2004. Correlation between detection rates of periodontopathic bacterial DNA in coronary stenotic artery plaque and in dental plaque samples. J Clin Microbiol, 42:1313–1315.

Isogai H, Isogai E, Yoshimura F, Suzuki T, Kagota W, Takano K. 1988. Specific inhibition of adherence of an oral strain of *Bacteroides gingivalis* 381 to epithelial cells by monoclonal antibodies against the bacterial fimbriae. Arch Oral Biol, 33:479–485.

Jacobs JA, Schot CS, Bunschoten AE, Schouls LM. 1996. Rapid species identification of *Streptococcus milleri* strains by line blot hybridization: Identification of a distinct 16S rRNA population closely related to *Streptococcus constellatus*. J Clin Microbiol, 34:1717–1721.

Jervøe-Storm PM, Koltzsch M, Falk W, Dörfler A, Jepsen S. 2005. Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. J Clin Periodontol, 32:778–783.

Kainz P. 2000. The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochim Biophys Acta*, 1494:23–27.

Kamaguchi A, Nakayama K, Ohyama T, Watanabe T, Okamoto M, Baba H. 2001. Coaggregation of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *Microbiol Immunol*, 44:649–656.

Kamaguchi A, Nakano M, Shoji M, Nakamura R, Sagane Y, Okamoto M, Watanabe T, Ohyama T, Ohta M, Nakayama K. 2004. Autolysis of *Porphyromonas gingivalis* is accompanied by an increase in several periodontal pathogenic factors in the supernatant. *Microbiol Immunol*, 48:541–545.

Kelk P, Claesson R, Hånström L, Lerner UH, Kalfas S, Johansson A. 2005. Abundant secretion of bioactive interleukin-1 β by human macrophages induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect Immun*, 73:453–458.

Kirby AC, Meghji S, Nair SP, White P, Reddi K, Nishihara T, Nakashima K, Willis AC, Sim R, Wilson M, Henderson B. 1995. The potent bone-resorbing mediator of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is homologous to the molecular chaperone GroEL. *J Clin Invest*, 96:1185–1194.

Kolenbrander PE, Andersen RN. 1989. Inhibition of coaggregation between *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* by lactose and related sugars. *Infect Immun*, 57:3204–3209.

Kolenbrander PE, Parrish KD, Andersen RN, Greenberg EP. 1995. Intergeneric coaggregation of oral *Treponema* spp. with *Fusobacterium* spp. and intrageneric coaggregation among *Fusobacterium* spp. *Infect Immun*, 63:4584–4588.

Kolodrubetz D, Spitznagel (Jr.) J, Wang B, Phillips LH, Jacobs C, Kraig E. 1996. Cis elements and trans factors are both important in strain-specific regulation of the leukotoxin gene in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 64:3451–3460.

- Kontani M, Ono H, Shibata H, Okamura Y, Tanaka T, Fujiwara T, Kimura S, Hamada S. 1996. Cysteine protease of *Porphyromonas gingivalis* 381 enhances binding of fimbriae to cultured human fibroblasts and matrix proteins. *Infect Immun*, 64:756–762.
- Kook JK, Sakamoto T, Nishi K, Kim MK, Seong JH, Son YN, Kim DK. 2005. Detection of *Tannerella forsythia* and/or *Prevotella intermedia* might be useful for microbial predictive markers for the outcome of initial periodontal treatment in Koreans. *Microbiol Immunol*, 49:9–16.
- Kumagai Y, Yagishita H, Yajima A, Okamoto T, Konishi K. 2005. Molecular mechanism for connective tissue destruction by dipeptidyl aminopeptidase IV produced by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 73:2655–2664.
- Lamont RJ, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D, Weinberg A. 1995. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun*, 63:3878–3885.
- Lange DE, Plagmann HC, Eenboom A, Promesberger A. 1977. Klinische Bewertungsverfahren zur Objektivierung der Mundhygiene. *Dtsch Zahnärztl Z*, 23:44–47.
- Lerner UH. 2004. New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptors superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15:64–81.
- de Lillo A, Booth V, Kyriacou L, Weightman AJ, Wade WG. 2004. Culture-independent identification of periodontitis-associated *Porphyromonas* and *Tannerella* populations by targeted molecular analysis. *J Clin Microbiol*, 42:5523–5527.
- Lux R, Miller JN, Park NH, Shi W. 2001. Motility and Chemotaxis in Tissue Penetration of Oral Epithelial Cell Layers by *Treponema denticola*. *Infect Immun*, 69:6276–6283.
- Madianos PN, Papanou PN, Nannmark U, Dahlen G, Sandros J. 1996. *Porphyromonas gingivalis* FDC381 multiplies and persists within human oral epithelial cells in vitro. *Infect Immun*, 64:660–664.

Madianos PN, Papapanou PN, Sandros J. 1997. *Porphyromonas gingivalis* infection of oral epithelium inhibits neutrophil transepithelial migration. *Infect Immun*, 65:3983–3990.

Machtei EE, Hausmann E, Dunford R, Grossi S, Ho A, Davis G, Chandler J, Zambon J, Genco RJ. 1999. Longitudinal study of predictive factors for periodontal disease and tooth loss. *J Clin Periodontol*, 26:374–380.

Maeda N, Okamoto M, Kondo K, Ishikawa H, Osada R, ATsurumoto, Fujita H. 1998. Incidence of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in periodontal health and disease. *Microbiol Immunol*, 42:583–589.

Marsh PD. 2005. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community lifestyle. *J Clin Periodontol*, 32:7–15.

Meyer DH, Sreenivasan PK, Fives-Taylor PM. 1991. Evidence for invasion of a human oral cell line by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 59:2719–2726.

Meyer DH, Lippmann JE, Fives-Taylor PM. 1996. Invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a dynamic, multistep process. *Infect Immun*, 64:2988–2997.

Micheelis W, Reich E. 1999. Dritte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS III). Ergebnisse, Trends und Problemanalysen auf der Grundlage bevölkerungsrepräsentativer Stichproben in Deutschland. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag.

Mülhardt C. 2002. In: *Der Experimentator: Molekularbiologie*, Bd 3. Kap. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, S. 71–99.

Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. 2002. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol*, 29:Supplement 3,10–21.

Nair SP, Meghji S, Wilson M, Reddi K, White P, Henderson B. 1996. Bacterially induced bone destruction: Mechanisms and misconceptions. *Infect Immun*, 64:2371–2380.

- Nakagawa I, Amano A, Kimura RK, Nakamura T, Kawabata S, Hamada S. 2000. Distribution and molecular characterization of *Porphyromonas gingivalis* carrying a new type of fimA gene. J Clin Microbiol, 38:1909–1914.
- Narayanan D, Hamlet S, Cullinan M, Davies R, Ellwood R, Bird P, Seymour GJ. 2005. The distribution of *Tannerella forsythia* in an adolescent and adult population. J Periodontal Res, 40:427–495.
- Neiburger EJ. 2000. Dentistry in ancient mesopotamia. J Mass Dent Soc, 49:16–19.
- Nishihara T, Koseki T. 2004. Microbial etiology of periodontitis. Periodontol 2000, 36:14–26.
- Ohta K, Makinen KK, Loesche WJ. 1986. Purification and characterization of an enzyme produced by *Treponema denticola* capable of hydrolyzing synthetic trypsin substrates. Infect Immun, 53:213–220.
- Overman PR. 2000. Biofilm: a new view of plaque. J Contemp Dent Pract, 1:18–29.
- Papapanou PN. 1996. Periodontal diseases: epidemiology. Ann Periodontol, 1:1–36.
- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. J Bacteriol, 183:3770–3783.
- Pfeilschifter J, Chenu C, Bird A, Mundy GR, Roodman GD. 1989. Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclastlike cells in vitro. J Bone Miner Res, 4:113–118.
- Pfister W. 2005. Parodontalerkrankungen - Grundlagen und Diagnostik - Ätiologie und Pathogenese - Wirtsreaktionen. In: Gängler P, Hoffmann T, Willershausen B, Schwenzer N, Ehrenfeld M, Hrsg. Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie, Zweite Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, S. 263–264.

Premaraj T, Kato N, Fukui K, Kato H, Watanabe K. 1999. Use of PCR and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis techniques for differentiation of *Prevotella intermedia* sensu stricto and *Prevotella nigrescens*. J Clin Microbiol, 37:1057–1061.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239:487–491.

Sakamoto M, Takeuchi Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. 2001. Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR. Microbiol Immunol, 45:39–44.

Scragg MA, Cannon SJ, Rangarajan M, Williams DM, Curtis MA. 1999. Targeted disruption of fibronectin-integrin interactions in human gingival fibroblasts by the RI protease of *Porphyromonas gingivalis* W50. Infect Immun, 67:1837–1843.

Shah HN, Gharbia SE. 1993. Proposal of a new species *Prevotella nigrescens* sp. nov. among strains previously classified as *Pr. intermedia*. FEMS Immunol Med Microbiol, 6:97.

Sharma A, Inagaki S, Sigurdson W, Kuramitsu HK. 2005. Synergy between *Tannerella forsythia* and *Fusobacterium nucleatum* in biofilm formation. Oral Microbiol Immunol, 20:39–42.

Simonson LG, Goodman CH, Bial JJ, Morton HE. 1988. Quantitative relationship of *Treponema denticola* to severity of periodontal disease. Infect Immun, 56:726–728.

Sixou M. 2003. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. Oral Dis:54–62.

Slots J, Gibbons RJ. 1978. Attachment of *Bacteroides melaninogenicus* subsp. *asaccharolyticus* to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and of periodontal pockets. Infect Immun, 19:254–264.

Slots J. 1982. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Clin Microbiol, 15:606–609.

Smola SF, Rettenberger G, Simmet T, Burysek L. 2003. Comparison of sample collection methods for the PCR detection of oral anaerobic pathogens. Lett Appl Microbiol, 36:101–105.

Socransky SS. 1979. Criteria for the infectious agents in dental caries and periodontal disease. J Clin Periodontol, 6:16–21.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RLJ. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol, 25:134–144.

Socransky SS, Haffajee AD. 2005. Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000, 38:135–187.

Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, Haapasalo M, Kontinen YT, Lindy O, Saari H, Uhto VJ. 1992. Identification of proteases from periodontopathogenic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblast-type interstitial collagenases. Infect Immun, 60:4491–4495.

Spitznagel J, Kraig E, Kolodrubetz D. 1991. Regulation of leukotoxin in leukotoxic and nonleukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infect Immun, 59:1394–1401.

Sugai M, Kawamoto T, Pérès SY, Ueno Y, Komatsuzawa H, Fujiwara T, Kurihara H, Suganaka H, Oswald E. 1998. The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a cytolethal distending toxin. Infect Immun, 66:5008–5019.

Suzuki N, Nakano Y, Yoshida Y, Ikeda D, Koga T. 2001. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes by multiplex PCR. J Clin Microbiol, 39:2002–2005.

Szewzyk U, Szewzyk R. 2003. Biofilme - die etwas andere Lebensweise. BIOSpektrum 9:253–255.

- Taichman NS, Dean RT, Sanderson CJ. 1980. Biochemical and morphological characterization of the killing of human monocytes by a leukotoxin derived from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 28:258–268.
- Takeshita A, Murakami Y, Yamashita Y, Ishida M, Fujisawa S, Kitano S, Hanazawa S. 1998. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae use beta2 integrin (CD11/CD18) on mouse peritoneal macrophages as a cellular receptor, and the CD18 beta chain plays a functional role in fimbrial signaling. *Infect Immun*, 66:4056–4060.
- Tanner AC, Kent RJ, Dyke TV, Sonis ST, Murray LA. 2005. Clinical and other risk indicators for early periodontitis in adults. *J Periodontol*, 76:573–581.
- Theilade E. 1986. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol*, 13:905–911.
- Thompson SA. 2002. *Campylobacter* surface-layers (S-layers) and immune evasion. *Ann Periodontol*, 7:43–53.
- Timmerman MF, Weijden GA. 2006. Risk factors for periodontitis. *Int J Dent Hygiene*, 4:2–7.
- Tran SD, Rudney JD. 1999. Improved multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol*, 37:3504–3508.
- Tsai CC, McArthur WP, Baehni PC, Hammond BF, Taichman NS. 1979. Extraction and partial characterization of a leukotoxin from a plaque-derived Gram-negative microorganism. *Infect Immun*, 25:427–439.
- Uitto VJ, Grenier D, Chan ECS, McBride BC. 1988. Isolation of a chymotrypsinlike enzyme from *Treponema denticola*. *Infect Immun*, 56:2717–2722.
- Wang B, Kraig E. 2000. Use of defined mutants to assess the role of the *Campylobacter rectus* S-layer in bacterium-epithelial cell interactions. *Infect Immun*, 68:1465–1473.

Weinberg A, Belton CM, Park Y, Lamont RJ. 1997. Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun*, 65:313–316.

van Winkelhoff AJ. 2003. Microbiology in diagnosis and treatment planning in periodontics. *In J Dent Hygiene*, 1:131–137.

van Winkelhoff AJ, Boutaga K. 2005. Transmission of periodontal bacteria and models of infection. *J Clin Periodontol*, 32:16–27.

Xie H, Kozlova N, Lamont RJ. 2004. *Porphyromonas gingivalis* genes involved in fimA regulation. *Infect Immun*, 72:651–658.

Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. 2000. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol*, 27:648–657.

Yoshida A, Tachibana M, Ansai T, Takehara T. 2005. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of black-pigmented *Prevotella* species in oral specimens. *Oral Microbiol Immunol*, 20:43–46.

Zambon JJ, DeLuca C, Slots J, Genco RJ. 1983. Studies of leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using the promyelocytic HL-60 cell line. *Infect Immun*, 40:205–212.

Zambon JJ. 1985. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 12:1–20.

Anhang

Tabelle 11

Quantitativer Nachweis von *A. actinomycetemcomitans* in Abhängigkeit vom klinischen Parameter Sondierungstiefe

<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Real-time PCR - Probenanzahl					
Sondierungstiefe	neg./ $< 10^3$	10^3	10^4	10^5	10^6	$\geq 10^7$
< 4 mm	20	5	6	1	0	0
4,5 - 6 mm	23	5	1	2	0	1
6,5 - 9 mm	22	5	2	0	1	1
> 9 mm	14	3	0	1	0	0
gesund	9	2	1	0	0	0

Tabelle 12

Häufigkeit des Nachweises von Leukotoxinen in Abhängigkeit vom klinischen Parameter Sondierungstiefe

<i>Leukotoxinen (Ltx)</i>	Real-time PCR - Probenanzahl		
Sondierungstiefe	<i>A. actinomycetemcomitans</i> nicht nachgewiesen	Leukotoxinen-negativ	Leukotoxinen-positiv
< 4 mm	20	9	3
4,5 - 6 mm	23	5	4
6,5 - 9 mm	22	5	4
> 9 mm	14	2	2
gesund	9	2	1

Tabelle 13

Quantitativer Nachweis von *P. gingivalis* in Abhängigkeit vom klinischen Parameter Sondierungstiefe

<i>P. gingivalis</i>	Real-time PCR - Probenanzahl					
Sondierungstiefe	neg./ $< 10^3$	10^3	10^4	10^5	10^6	$\geq 10^7$
< 4 mm	15	11	4	1	1	0
4,5 - 6 mm	10	8	7	3	1	3
6,5 - 9 mm	8	6	8	4	2	3
> 9 mm	5	6	1	1	4	1
gesund	7	3	2	0	0	0

Tabelle 14

Häufigkeit des Nachweises von Fimbrillinen *fimA* Typ II in Abhängigkeit vom klinischen Parameter Sondierungstiefe

Fimbrillinen <i>fimA</i> Typ II	Real-time PCR - Probenanzahl		
Sondierungstiefe	<i>P. gingivalis</i> nicht nachgewiesen	Fimbrillinen <i>fimA</i> Typ II - negativ	Fimbrillinen <i>fimA</i> Typ II - positiv
< 4 mm	20	9	3
4,5 - 6 mm	23	5	4
6,5 - 9 mm	22	5	4
> 9 mm	14	2	2
gesund	9	2	1

Tabelle 15

Quantitativer Nachweis von *P. intermedia* in Abhängigkeit vom klinischen Parameter Sondierungstiefe

<i>P. intermedia</i>	Real-time PCR - Probenanzahl					
Sondierungstiefe	neg./ < 10³	10³	10⁴	10⁵	10⁶	≥ 10⁷
< 4 mm	17	4	5	6	0	0
4,5 - 6 mm	15	1	9	4	3	0
6,5 - 9 mm	11	3	6	7	2	2
> 9 mm	9	2	3	1	1	2
gesund	2	2	6	1	1	0

Tabelle 16

Quantitativer Nachweis von *T. forsythia* in Abhängigkeit vom klinischen Parameter Sondierungstiefe

<i>T. forsythia</i>	Real-time PCR - Probenanzahl					
Sondierungstiefe	neg./ < 10³	10³	10⁴	10⁵	10⁶	≥ 10⁷
< 4 mm	9	7	9	7	0	0
4,5 - 6 mm	6	8	5	6	2	5
6,5 - 9 mm	5	2	8	2	8	6
> 9 mm	2	1	2	2	4	7
gesund	3	6	0	2	0	1

Tabelle 17

Quantitativer Nachweis der *Treponema sp.* in Abhängigkeit vom klinischen Parameter Sondierungstiefe

<i>Treponema sp.</i>	Real-time PCR - Probenanzahl					
Sondierungstiefe	neg./ $< 10^3$	10^3	10^4	10^5	10^6	$\geq 10^7$
< 4 mm	7	14	8	3	0	0
4,5 - 6 mm	10	8	10	2	1	1
6,5 - 9 mm	6	5	8	10	1	1
> 9 mm	5	6	1	4	1	1
gesund	4	4	1	3	0	0

Tabelle 18

Quantitativer Nachweis von *T. denticola* in Abhängigkeit vom klinischen Parameter Sondierungstiefe

<i>T. denticola</i>	Real-time PCR - Probenanzahl					
Sondierungstiefe	neg./ $< 10^3$	10^3	10^4	10^5	10^6	$\geq 10^7$
< 4 mm	22	8	1	1	0	0
4,5 - 6 mm	12	9	6	3	1	1
6,5 - 9 mm	9	6	7	5	2	2
> 9 mm	7	5	1	1	2	2
gesund	11	0	1	0	0	0

Tabelle 19

Quantitativer Nachweis von *S. constellatus* in Abhängigkeit vom klinischen Parameter Sondierungstiefe

<i>S. constellatus</i>	Real-time PCR - Probenanzahl					
Sondierungstiefe	neg./ $< 10^3$	10^3	10^4	10^5	10^6	$\geq 10^7$
< 4 mm	18	7	5	2	0	0
4,5 - 6 mm	14	10	4	3	1	0
6,5 - 9 mm	11	6	12	2	0	0
> 9 mm	9	3	6	0	0	0
gesund	8	4	0	0	0	0

Tabelle 20

Quantitativer Nachweis von *C. rectus* in Abhängigkeit vom klinischen Parameter Sondierungstiefe

<i>C. rectus</i>	Real-time PCR - Probenanzahl					
Sondierungstiefe	neg./ $< 10^3$	10^3	10^4	10^5	10^6	$\geq 10^7$
< 4 mm	13	8	8	3	0	0
4,5 - 6 mm	7	7	6	8	3	1
6,5 - 9 mm	3	6	6	13	2	1
> 9 mm	1	2	6	8	1	0
gesund	3	4	3	1	1	0

Tabelle 21

Quantitativer Nachweis von *F. nucleatum* in Abhängigkeit vom klinischen Parameter Sondierungstiefe

<i>F. nucleatum</i>	Real-time PCR - Probenanzahl					
Sondierungstiefe	neg./ $< 10^3$	10^3	10^4	10^5	10^6	$\geq 10^7$
< 4 mm	10	14	4	4	0	0
4,5 - 6 mm	6	13	7	3	3	0
6,5 - 9 mm	0	7	16	6	2	0
> 9 mm	1	5	8	3	1	0
gesund	3	7	1	1	0	0

Tabelle 22

Quantitativer Nachweis von der Gesamtzahl der Bakterien in Abhängigkeit vom klinischen Parameter Sondierungstiefe

Gesamtbakterien	Real-time PCR - Probenanzahl					
Sondierungstiefe	neg./ $< 10^3$	10^3	10^4	10^5	10^6	$\geq 10^7$
< 4 mm	0	18	4	4	4	2
4,5 - 6 mm	0	7	12	4	7	2
6,5 - 9 mm	0	4	7	11	6	3
> 9 mm	0	2	4	6	4	2
gesund	0	7	3	2	0	0

Tabelle 23

Darstellung des quantitativen Nachweises der Gesamtzahl der Bakterien, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* und *T. forsythia* mittels Real-time PCR bei unbehandelten Parodontitispatienten bzw. Parodontitispatienten mit nicht dauerhaft erfolgreicher Parodontalbehandlung.

Gesamtbakterien	Real-time PCR - Probenanzahl					
Patientengruppe	neg./ < 10³	10³	10⁴	10⁵	10⁶	≥ 10⁷
vor Therapiebeginn	0	18	14	13	15	8
ohne Therapieerfolg	0	13	13	12	6	1

<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Real-time PCR - Probenanzahl					
Patientengruppe	neg./ < 10³	10³	10⁴	10⁵	10⁶	≥ 10⁷
vor Therapiebeginn	45	12	5	4	1	1
ohne Therapieerfolg	34	6	4	0	0	1

<i>P. gingivalis</i>	Real-time PCR - Probenanzahl					
Patientengruppe	neg./ < 10³	10³	10⁴	10⁵	10⁶	≥ 10⁷
vor Therapiebeginn	25	22	12	2	3	4
ohne Therapieerfolg	13	9	8	6	5	4

<i>P. intermedia</i>	Real-time PCR - Probenanzahl					
Patientengruppe	neg./ < 10³	10³	10⁴	10⁵	10⁶	≥ 10⁷
vor Therapiebeginn	33	6	13	8	4	4
ohne Therapieerfolg	19	4	10	10	2	0

<i>T. forsythia</i>	Real-time PCR - Probenanzahl					
Patientengruppe	neg./ < 10³	10³	10⁴	10⁵	10⁶	≥ 10⁷
vor Therapiebeginn	13	11	13	9	6	16
ohne Therapieerfolg	9	7	11	8	8	2

Tabelle 24

Darstellung des quantitativen Nachweises von *Treponema sp.*, *T. denticola*, *S. constellatus*, *C. rectus* und *F. nucleatum* mittels Real-time PCR bei unbehandelten Parodontitispatienten bzw. Parodontitispatienten mit nicht dauerhaft erfolgreicher Parodontalbehandlung.

<i>Treponema sp.</i>	Real-time PCR - Probenanzahl					
Patientengruppe	neg./ < 10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	≥ 10 ⁷
vor Therapiebeginn	17	24	10	12	3	2
ohne Therapieerfolg	11	9	17	7	0	1

<i>T. denticola</i>	Real-time PCR - Probenanzahl					
Patientengruppe	neg./ < 10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	≥ 10 ⁷
vor Therapiebeginn	24	19	10	6	4	5
ohne Therapieerfolg	25	9	6	4	1	0

<i>S. constellatus</i>	Real-time PCR - Probenanzahl					
Patientengruppe	neg./ < 10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	≥ 10 ⁷
vor Therapiebeginn	33	13	16	5	1	0
ohne Therapieerfolg	19	13	11	2	0	0

<i>C. rectus</i>	Real-time PCR - Probenanzahl					
Patientengruppe	neg./ < 10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	≥ 10 ⁷
vor Therapiebeginn	16	17	14	18	3	0
ohne Therapieerfolg	8	6	12	14	3	2

<i>F. nucleatum</i>	Real-time PCR - Probenanzahl					
Patientengruppe	neg./ < 10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	≥ 10 ⁷
vor Therapiebeginn	8	27	17	10	6	0
ohne Therapieerfolg	9	12	18	6	0	0

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Thomas Voigt
Geburtsdatum: 21.05.1978
Geburtsort: Potsdam
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

09/1984 – 08/1990 Polytechnische Oberschule 11,
Potsdam-Babelsberg
09/1990 – 07/1991 Polytechnische Oberschule 33,
Potsdam-Babelsberg
08/1991 – 06/1997 Hermann-von-Helmholtz-Gymnasium,
Potsdam
06/1997 Abitur

Zivildienst

08/1997 – 08/1998 Klinikum „Ernst von Bergmann“,
Potsdam

Hochschulausbildung

10/1998 – 12/2003 Studium der Zahnmedizin,
Friedrich-Schiller-Universität, Jena
01/2004 Zahnärztliche Approbation
02/2004 – 05/2004 Assistenz Zahnarzt,
Praxis Dr. Voigt und Dr. Weickardt, Potsdam
06/2004 – 07/2005 Weiterbildungsassistent,
Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der
Friedrich-Schiller-Universität, Jena
seit 08/2005 Assistenz Zahnarzt,
Praxis Dr. Voigt und Dr. Weickardt, Potsdam

Jena, am 21.06.2006

Thomas Voigt

Danksagung

Ich danke

- Frau PD Dr. med. habil. S. Eick für die Überlassung des interessanten Themas und ihre umfassende fachliche Beratung bei der Erstellung der Dissertation,
- Herrn Prof. Dr. med. habil. E. Straube für die Erlaubnis, die Laboratorien im Institut für Medizinische Mikrobiologie regelmäßig nutzen zu dürfen,
- Herrn Prof. Dr. med. habil. W. Pfister für seine Hilfe bei den Präsentationen in Amsterdam und Berlin,
- meiner Familie für ihre verständnisvolle Unterstützung.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. habil. Sigrun Eick und Prof. Dr. med. habil. Wolfgang Pfister,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, am 21.06.2006

Thomas Voigt, Verfasser